

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**EFEKT VITAMÍNU E NA OXIDAČNÍ STRES A NA BAZÁLNÍ
MEMBRÁNU PLIC POTKANŮ S NEDOSTATKEM VITAMÍNU A**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Katarína Fabšíková

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Katarína Fabšíková

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Efekt vitamínu E na oxidační stres a na bazální membránu plic potkanů s nedostatkem vitamínu A

V experimente popísanom v tejto diplomovej práci sa sledoval efekt dlhodobého nedostatku vitamínu A na bazálnu membránu pľúc potkanov. Potkany boli počas celého pokusu rozdelené do viacerých skupín líšiacich sa zložením potravy a pozorovali sa zmeny pľúcnej bazálnej membrány. Následne sa pozoroval efekt vitamínu E a kyseliny retinovej na vzniknuté zmeny v membráne. Počas experimentu bola hodnotená miera oxidačného stresu prostredníctvom hladín glutatiónu a malóndialdehydu, ktoré vystupujú ako jeho markery. Tieto hladiny boli u všetkých zvierat experimentu stanovované chromatografickou metódou HPLC. Taktiež sa hodnotil oxidačný stres pomocou iných ukazovateľov ako je hrúbka bazálnej membrány, depozitá kolagénových vlákien či hladiny retinolu a α -tokoferolu v plazme a v tkanivách. Tento experiment mal potvrdiť významnú úlohu vitamínov plniacich antioxidačnú funkciu ako v prevencii, tak aj v liečbe patologických zmien vzniknutých v dôsledku zvýšeného oxidačného stresu. Podávanie zvýšeného množstva vitamínu E a kyseliny retinovej sa osvedčilo ako vhodný prostriedok na obnovu poškodenej a zmenenej bazálnej membrány. Nepriaznivý vplyv zníženého príjmu vitamínu A bol tiež potvrdený.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Katarína Fabšíková

Supervisor: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of vitamin E on oxidative stress and the basement membrane in lungs in vitamin A-deficient rats

In the experiment described in this thesis there was being observed the effect of long-term deficiency of vitamin A on the basement membrane in rat lungs. Rats were divided during the experiment into several groups differing in composition of feed and the changes of pulmonary basement membrane were being observed. Consequently, the effect of vitamin E and retinoic acid on membrane modifications was watched, too. During the experiment there was evaluated the rate of oxidative stress by the medium of glutathione and malondialdehyde levels, which act as its markers. These levels in all experimental animals were specified by HPLC chromatography. Also, the oxidative stress was assessed using other markers such as thickness of the basement membrane, deposits of collagen fibers and levels of retinol and α -tocopherol in plasma and tissues. This experiment should confirm the important role of vitamins acting as antioxidants in prevention and treatment of pathological changes caused by increased oxidative stress. Administration of increased amount of vitamin E and retinoic acid acquitted well as appropriate agent for recovery of the damaged and altered basement membrane. Adverse effect of decreased intake of vitamin A was also confirmed.

Obsah

Zoznam obrázkov.....	7
Zoznam tabuliek	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1 Extracelulárna matrix	10
2.1.1 Kolagény	11
2.1.2 Molekuly bunkovej adhézie.....	12
2.1.3 Epiteliálno-mezenchymálny prechod	14
2.2 Bazálna membrána	15
2.2.1 Štruktúra a kompozícia bazálnej membrány.....	16
2.2.2 Stavba bazálnej membrány	22
2.2.3 Funkcie bazálnej membrány	23
2.3 Anatómia a fyziológia pľúc.....	25
2.3.1 Dýchací systém	25
2.3.2 Alveolus a bazálna alveolo-kapilárna membrána	26
2.3.3 Zmeny bazálnej membrány.....	27
2.4 Vitamín A.....	29
2.4.1 Karotenoidy a retinoidy	29
2.4.2 Absorpcia, transport a metabolizmus vitamínu A	31
2.4.3 Antioxidačné a prooxidačné funkcie vitamínu A	32
2.4.4 Retinoidové receptory a ich funkcie	34
2.4.5 Úloha vitamínu A v pľúcnych funkciách a ich vývoji.....	35
2.5 Vitamín E	37
2.5.1 Absorpcia, transport a metabolizmus vitamínu E.....	39
2.5.2 Príjem vitamínu E	40
3 CIEĽ PRÁCE.....	41

4	MATERIÁL A METODIKA	42
4.1	Použité činidlá	42
4.2	Použité prístroje a nástroje	42
4.3	Laboratórne zvieratá	43
4.4	Laboratórna potrava	44
4.5	Podávanie potravy laboratórnym zvieratám	46
4.6	Získavanie biologických vzoriek	47
4.7	Extrakcia retinoidov, α -tokoferolu a ich stanovenie	48
4.8	Stanovenie hladín malóndialdehydu	49
4.9	Stanovenie hladín glutatiónu	50
4.10	Stanovenie hladín oxidovaného glutatiónu	51
4.11	Spracovávanie vzoriek pre elektrónovú mikroskopiu	52
4.12	Získavanie a farbenie rezov a štúdium ultraštruktúry	55
5	VÝSLEDKY	58
5.1	Štúdium telesnej hmotnosti	58
5.2	Stanovenie hladín retinolu, retinyl-palmitátu a α -tokoferolu v plazme a v pľúcach	59
5.3	Stanovenie markerov epiteliálno-mezenchymálneho prechodu	60
5.4	Stanovenie parametrov oxidačného stresu	61
5.5	Štúdium ultraštruktúry alveolárnej bazálnej membrány	63
6	DISKUSIA	69
7	ZÁVERY	73
8	ZOZNAM SKRATIEK	74
9	LITERATÚRA	77

Zoznam obrázkov:

Obrázok 1: Štruktúra laminínov	20
Obrázok 2: Štruktúra retinolu, retinaldehydu a kyseliny retinovej.....	30
Obrázok 3: Štruktúra betakaroténu	30
Obrázok 4: Štruktúra tokoferolu a tokotrienolu.....	37
Obrázok 5: Vývoj telesnej hmotnosti v závislosti od podávanej potravy.....	59
Obrázok 6: Namerané hladiny malóndialdehydu v pľúcach potkanov všetkých skupín experimentu uvedené v nmol/g pľúcneho tkaniva.	62
Obrázok 7: Namerané hodnoty glutatiónu a oxidovaného glutatiónu uvedené ako pomer GSH/GSSG.....	63
Obrázok 8: Alveolárne bazálne membrány pľúc potkanov rôznych skupín zvierat.....	65
Obrázok 9: Detaily zhlukov kolagénových vlákien v alveolárnej bazálnej membráne pľúc potkanov skupiny VAD.....	66
Obrázok 10: Depozitá kolagénu typu I v alveolárnej bazálnej membráne potkanov skupiny VAD+E.	67
Obrázok 11: Hrúbka bazálnych membrán všetkých skupín experimentu.	67

Zoznam tabuliek:

Tabuľka 1: Zloženie potravy podávanej experimentálnym zvieratám	45
Tabuľka 2: Detailné zloženie minerálnej zmesi AIN-93G-MX	45
Tabuľka 3: Detailné zloženie vitamínovej zmesi AIN-93G-VX.....	46
Tabuľka 4: Koncentrácie retinolu, retinyl-palmitátu a α -tokoferolu v plazme a pľúcach potkanov všetkých experimentálnych skupín	60

1 ÚVOD

V súčasnej dobe trpí pľúcnyimi chorobami nezanedbateľné množstvo populácie. Ich počet pravdepodobne kvôli stále viac znečistenému prostrediu stúpa. Preto je pre spoločnosť prínosné venovať sa výskumu týchto chorôb ako je napríklad chronická obštrukčná pľúcna choroba, idiopatická pľúcna fibróza, astma a iné. Bolo realizovaných už mnoho experimentov, v ktorých sa skúmala štruktúra pľúc a vzniknuté zmeny súvisiace s rozvojom danej choroby. Táto práca sa zaoberá vplyvom vitamínov A a E, ktoré sú bežnou súčasťou stravy človeka, pričom je zameraná na deje a zmeny v pľúcnej bazálnej membráne, ktoré vznikajú v dôsledku nedostatočného príjmu vitamínu A. Deficit vitamínu A totiž spôsobuje zmeny v štruktúre a kompozícii pľúcnej membrány, ktoré sú porovnateľné so zmenami v prípade spomínaných pľúcnych chorôb. Tiež sa zameriava na prínos a priaznivý vplyv zvýšeného príjmu vitamínu E a kyseliny retinovej. Tieto vitamíny (retinol, α -tokoferol a kyselina retinová) sú známe a dôležité pre svoj antioxidačný účinok. V mnohých štúdiách bolo potvrdené aj ich prooxidačné pôsobenie. Táto práca mala teda potvrdiť alebo vyvrátiť tieto fakty a skúmal sa ich efekt práve na pľúcnu membránu, ktorá bola nepriaznivo zmenená a ovplyvnená nedostatkom vitamínu A.

Pre dosiahnutie požadovaných hladín vitamínov v plazme a tkanivách bola použitá potrava s presne definovaným zložením. Každá zo skupín potkanov bola kŕmená potravou s iným zložením počas 60 dní. Táto doba bola ideálna na dosiahnutie požadovaného efektu. Následne boli zvieratám podávané intraperitoneálne injekcie s kyselinou retinovou a pozoroval sa jej účinok na vzniknuté zmeny.

Po uplynutí 70 dní od začiatku experimentu sa vyhodnotili dosiahnuté výsledky, pričom celý pokus bol zameraný na alveolárnu membránu pľúc, na zmeny jej štruktúry, kompozície a tiež sa sledovala hrúbka membrány, obsah nahromadeného kolagénu, ale dôležitý bol aj vplyv zloženia potravy na hmotnosť zvierat.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Extracelulárna matrix

Extracelulárna matrix (ECM) je časť živočíšnych tkanív, ktorá sa nachádza mimo buniek v intersticiálnom prostredí a plní mnoho významných funkcií ako je napríklad štrukturálna podpora buniek organizmu, vzájomné oddelenie jednotlivých tkanív či ovplyvňovanie komunikácie medzi bunkami a regulácia základných bunkových procesov. Dôležitá je najmä v skorých štádiách diferenciácie, pretože vtedy tvorí matrix sieť, prostredníctvom ktorej sa môžu bunky pohybovať.

Extracelulárna matrix má formu komplexnej siete makromolekúl, pričom jej jednotlivé komponenty sa tvoria v bunkách, ktoré sa v nej nachádzajú a sú z nich vylučované exocytózou. ECM sa skladá z troch hlavných proteínových súčastí. Sú to proteoglykány s vysokou viskozitou, ktoré vznikajú kovalentným spojením proteínov a dlhých reťazcov polysacharidov nazývaných glykozaminoglykány (GAG). Ďalšou zložkou sú nerozpustné fibrilárne (vláknité) proteíny ako elastín a kolagén, ktoré poskytujú tkanivám pevnosť a pružnosť. Poslednou súčasťou sú rozpustné multiadhezívne proteíny nazývané fibronektín či laminín a ich hlavnou funkciou je viazať komponenty matrix k povrchu buniek.

ECM sa v hojnej miere nachádza hlavne v spojovacích tkanivách, kde zabezpečuje najmä mechanickú odolnosť. Zloženie, množstvo a úloha ECM však závisí od druhu a funkcie tkanív. V šľachách musí zabezpečovať pevnosť, v chrupavkách odpruženie a v hladkých svaloch artérií musí poskytnúť pevnosť i pružnosť.

Samozrejme, extracelulárna matrix a bunky medzi sebou určitým spôsobom komunikujú či už priamo alebo nepriamo prostredníctvom signálnych dráh. Na povrchu bunky v plazmatickej membráne sa nachádzajú početné receptory bunkovej adhézie, na ktoré sa viažu komponenty matrix a tým priamo aktivujú signálne dráhy v cytosóle. Tieto molekuly bunkovej adhézie (CAM), hlavne integríny sú teda spojovacím článkom medzi bunkou a ECM. Integríny sú glykoproteíny nachádzajúce sa v plazmatickej membráne, pričom jeden ich koniec je vo vnútri bunky a druhý je extracelulárny a viažu sa na komponenty matrix. Keď dôjde k spojeniu medzi týmto koncom a súčasťami

matrix, integríny podstupia zmenu konformácie a to má za následok vznik signálu. Ten sa do vnútra bunky odovzdá prostredníctvom kinázy, ktorá je dočasne pripojená na intracelulárny koniec integrínu. Tieto signály prijaté vďaka integrínom vyvolávajú rôzne bunkové procesy ako napríklad rast, diferenciácia alebo delenie.

Extracelulárna matrix je teda veľmi dôležitou súčasťou organizmu vďaka svojim početným funkciám, čím zohráva významnú úlohu v embryonálnom vývoji a organogenéze, v procesoch tvorby metastáz, hojenia rán či v angiogenéze. Zmeny v jej tvorbe, zložení a katabolizme sú spojované s rôznymi dedičnými i získanými chorobami ako je ateroskleróza, rakovina, fibróza či artritída.

2.1.1 Kolagény

Ako bolo spomenuté vyššie, kolagény sú súčasťou ECM a predstavujú jeho najhlavnejšiu zložku. Vyskytujú sa u všetkých mnohobunkových živočíchov, pričom u cicavcov tvorí 25 – 35 % celkového množstva proteínov v tele. V hojnom množstve ho môžeme nájsť v kostiach, šľachách a koži, kde je hlavným proteínom a udeľuje týmto tkanivám mechanickú odolnosť. Mnoho kolagénu sa však nachádza aj v rohovke, chrupavkách či cievach. Vytvárajú ho bunky nazývané fibroblasty, u chrupaviek chondroblasty a v prípade kostí sa jedná o osteoblasty. Existuje mnoho druhov kolagénu, no väčšinu z nich (80 – 90 %) tvorí kolagén typu I, II a III.

Je známych veľa typov kolagénu, no literatúry uvádzajú rozdielne čísla. Niektoré tvrdia, že ich existuje dokonca 28 typov. Každopádne, hlavné kolagény extracelulárnej matrix sú vláknité, medzi ktoré patria typy I, II, III a V; a kolagény amorfné, kde patria typy IV, VI, VII a VIII. Ostatné kolagény ako napríklad X, XVII a vyššie sú taktiež prítomné, no nie sú tak významné najmä po kvantitatívnej stránke ako predošlé.

Vo všeobecnosti sa delia kolagény do 5 rodín:

- 1.) Vláknité kolagény – túto skupinu tvoria kolagény, ktorých molekuly sú pospájané do priečne pruhovaných vlákien rôznych tkanív, pričom ich α -reťazce vytvárajú ako homotriméry tak aj heterotriméry; medzi vláknité kolagény radíme typy I, II, III, V a XI (z novo objavených aj XXIV a XXVII)

- 2.) „FACIT“ kolagény (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helix) – ide o tzv. vlákno-asociované kolagény s prerušenou trojitou skrutkovicou, ktoré sa združujú s vláknitými kolagénmi a vďaka tomu môžu interagovať s ďalšími molekulami ECM; tieto kolagény reprezentujú typy IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI a XXII
- 3.) Kolagény tvoriace siete – patria tu typy IV, VIII a X, pričom typ IV je hlavnou súčasťou bazálnej membrány, kde vytvára sieť interagujúcu s ostatnými komponentami BM
- 4.) Transmembránové kolagény – patria tu jednak kolagény typu XIII, XVII, XXIII a XXV, ale aj proteíny kolagénu podobné (napríklad makrofágový receptor MARCO)
- 5.) Ostatné kolagény – patria tu zvyšné typy kolagénov ako napríklad typ XV, XVIII, XXVI či XXVIII a každý z nich je tvorený len jedným α -reťazcom; tieto kolagény sú súčasťou špecializovaných štruktúr v tkanivách

Čo sa týka ich štruktúry, vo všeobecnosti sú tvorené tromi reťazcami α , ktoré sú okolo seba vzájomne obtočené, čím vytvárajú štruktúru trojitej skrutkovice (triple-helix). Kolagén typu I sa vyskytuje častejšie ako ostatné typy a vo všetkých orgánoch je bohaty distribuovaný. Preto je aj jeho štruktúra preskúmaná detailnejšie. Trojitá skrutkovica kolagénu typu I je 1,5 nm široká v priemere a dlhá 300 nm. Tvoria ju tri vzájomne obtočené reťazce, pričom dva z nich sú identické $\alpha 1(I)$ a tretí je reťazec $\alpha 2(I)$.

Okrem typu I patrí medzi najdôležitejšie kolagény tiež typ III a V. Typ III sa nachádza najmä v spojovacích tkanivách okrem kostí a tiež v pľúcach, koži, cievnom systéme a často sa vyskytuje spolu s kolagénom typu I. Tvoria ho tri rovnaké reťazce $\alpha 1(III)$, takže má formu homotriméru. Kolagén typu V vytvára heterotrimér, ktorý sa skladá z troch odlišných α reťazcov ($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$). Často sa nachádza tiež v kombinácii s typom I aj III a môžeme ho nájsť napríklad v kostiach, v stróme rohovky, v intersticiálnej matrix pečene, placenty, pľúc či svalov.

2.1.2 Molekuly bunkovej adhézie

Molekuly bunkovej adhézie (označované ako CAMs – Cell Adhesion Molecules) sú proteíny, ktoré sa nachádzajú v membráne na povrchu bunky

a zodpovedajú za spojenia buniek s extracelulárnou matrix alebo medzi bunkami navzájom, čím poskytujú bunkám pomoc pri ukotvení v okolitom prostredí ako aj pri tvorbe zložitejších štruktúr a zabezpečujú súdržnosť tkanív. Plnia funkciu transmembránových receptorov a skladajú sa z troch domén: vnútrobunková (cytoplazmatická) doména interagujúca s cytoskeletom; transmembránová doména a mimobunková doména (extracelulárna), ktorou sa CAM spája s ostatnými typmi CAM alebo súčasťami ECM.

Bolo identifikovaných mnoho rozličných typov molekúl bunkovej adhézie, ktoré sa delia do piatich hlavných rodín:

- 1.) Cadheríny – patria tiež do skupiny homofilných molekúl bunkovej adhézie, pretože sa viažu len na cadheríny; patria sem napríklad E-cadherín, P-cadherín či N-cadherín
- 2.) Selektíny – sú súčasťou skupiny heterofilných molekúl bunkovej adhézie a viažu sa s karbohydrátmi ako je napríklad mucín a sú zodpovedné za mnohé obranné mechanizmy organizmu
- 3.) Imunoglobulíny – viažu sa buď na integríny alebo na iné imunoglobulíny, takže môžu byť heterofilné aj homofilné
- 4.) Integríny – tvoria veľmi dôležitú skupinu CAM, pretože zabezpečujú komunikáciu medzi bunkou a ECM; sú to glykoproteíny typu heterodiméru zloženého z podjednotiek alfa a beta, pričom obe sú dôležité pre väzbu a ovplyvňujú tvar aj mobilitu buniek a ich cyklus; zabezpečujú väzbu buď medzi bunkami navzájom alebo medzi bunkou a súčasťami extracelulárnej matrix ako napríklad laminín, vitronektín, kolagén či fibronektín; okrem bunkovej adhézie zabezpečujú prostredníctvom interakcií s rôznymi enzýmami taktiež prenos signálu z matrix do vnútra bunky, čím spustia signálnu kaskádu a regulujú tak mnoho funkcií ako napríklad rast bunky, delenie, diferenciácia či aktivácia a apoptóza
- 5.) Receptory, ktoré navádzajú lymfocyty do tkanív známe tiež ako adresíny

Molekuly bunkovej adhézie sa zúčastňujú na rôznych procesoch buniek. To robí tieto molekuly nevyhnutnými hlavne počas embryogenézy či regenerácie tkanív. Tiež hrajú dôležitú úlohu v nádorových procesoch, tvorbe metastáz a patogenéze mnohých chorôb a to najmä integríny.

2.1.3 Epiteliálno-mezenchymálny prechod

Epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT) je biologický proces, ktorý umožňuje polarizovanej epiteliálnej bunke, ktorá normálne interaguje s bazálnou membránou prostredníctvom bazálneho povrchu, podstúpiť násobné biochemické zmeny, ktoré jej umožňujú získať fenotyp mezenchymálnej bunky, čo zahŕňa zvýšenú migračnú kapacitu, invazívnosť, zvýšenú odolnosť voči apoptóze a výraznú nadprodukciu komponentov ECM (Kalluri and Nielson 2003). Počas tohto procesu dochádza k degradácii bazálnej membrány a bunka pôvodne vytvorená v epiteliálnej vrstve túto vrstvu opúšťa ako bunka mezenchymálna. Tiež dochádza k zániku medzibunkových spojení a k zmene adhézie.

Proces EMT hrá dôležitú úlohu aj v mnohých štádiách vývoja vrátane gastrulácie, čo spôsobuje v konečnom dôsledku vznik vysoko mobilných buniek, ktoré sa začleňujú do mnohých rozličných tkanív (Nieto 2001, Shook and Keller 2003). EMT zahŕňa mnoho rôznych procesov. Dochádza k aktivácii transkripčných faktorov, expresii cytoskeletárnych proteínov a ich reorganizácii, tvoria sa proteíny špecifické pre bunkový povrch a sú produkované enzýmy, ktoré degradujú extracelulárnu matrix. Často sa vzniknuté či zaniknuté proteíny využívajú ako markery pre epitel alebo mezenchým, čím sa dá potvrdiť alebo vyvrátiť prítomnosť epiteliálno-mezenchymálneho prechodu a následne rôznych chorôb. Medzi epiteliálne markery patrí napríklad aquaporín-5 či E-cadherín a mezenchymálnym markerom je napríklad vimentín.

Dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje epiteliálno-mezenchymálny prechod, je TGF- β_1 (Transforming Growth Factor). Tento faktor aktivuje EMT v alveolárnych epiteliálnych bunkách ako in vitro tak aj in vivo. To má za následok zmenu v množstve spomínaných markerov. Expresia epiteliálnych markerov je znížená a naopak, mezenchymálne markery sú zvýšené. TGF- β_1 teda hrá dôležitú úlohu pri vývoji organizmu, ale aj pri vzniku najmä fibrózných chorôb, rakoviny či cievnych a autoimunitných porúch. Proces epiteliálno-mezenchymálneho prechodu je však spojovaný nielen so vznikom chorôb, ale aj s regeneráciou tkanív či hojením rán.

2.2 Bazálna membrána

Bazálna membrána (BM) sa nachádza medzi epiteliálnymi či endoteliálnymi bunkami a bunkami, ktoré sa nachádzajú pod nimi. Tvorí teda akúsi bariéru medzi epitelom alebo endotelom a okolitým spojovacím tkanivom, pričom sa jedná o vysoko špecializovanú formu extracelulárnej matrix. Je hrubá 50-350 nm, najčastejšie má však 60-80 nm, takže tvorí len tenkú vrstvu – laminu, ktorá má amorfnú a hustú štruktúru. Väčšinou sa v tele nachádza ako súvislá vrstva, no v niektorých miestach sa môže vyskytovať aj ako prerušovaná. Bazálna membrána sa podieľa na rôznych funkciách organizmu. Hrá úlohu napríklad v embryonálnom vývoji, vo filtrácii krvi a vzduchu alebo v podpore tkanivovej štruktúry. Pôsobí tiež ako mediátor pri adhézii, proliferácii, migrácii, polarizácii a diferenciácii buniek a taktiež sa zúčastňuje regeneračných aj patologických procesov, obnovy a údržby tkanív, vývoja alebo tvorby tumorov. Tvorí anatomickú bariéru, vďaka ktorej sú tkanivá a orgány chránené pred mechanickým stresom a vonkajšími faktormi. Sú v nej tiež uskladnené rôzne proteíny, enzýmy a rastové faktory.

Elektrónovou mikroskopiou sa zistilo, že bazálna membrána je zložená z dvoch vrstiev. Jedná sa o vrstvu nazývanú *lamina rara*, alebo tiež *lamina lucida*, čiže svetlá vrstva, pretože je v nej malá hustota elektrónov. Naopak, vrstva s veľkou elektrónovou hustotou sa nazýva *lamina densa*. *Lamina lucida* sa nachádza na tej strane bazálnej membrány, ktorá prilieha k povrchu buniek a *lamina densa* je na strane BM, ktorá je v kontakte so spojovacími tkanivami. Existuje však výnimka, kedy bazálna membrána nie je dvojvrstvová, ale skladá sa z troch vrstiev. Tak je to v prípade glomerulárnej bazálnej membrány, v ktorej sa *lamina densa* nachádza medzi dvoma vrstvami *lamina lucida*. Bazálna membrána je veľmi podobná extracelulárnej matrix, no líši sa najmä v hustote, štruktúre, molekulárnej kompozícii a v tom, že je vždy v kontakte s bunkami.

Ako bolo spomenuté, bazálna membrána glomerulov tvorí výnimku vďaka svojej trojvrstvovej kompozícii, pričom podobná štruktúra BM tvorenej z troch vrstiev je aj v pľúcnych alveolách. V týchto orgánoch pôsobia vrstvy bazálnej membrány ako vysoko selektívne filtre, ktoré v obličkách regulujú výstup malých molekúl z krvi a v pľúcach vstup molekúl zo vzduchu do organizmu.

Bazálne membrány sa nachádzajú skoro vo všetkých orgánoch tela a môžeme ich nájsť aj v okolí kostrových svalových vlákien i hladkých svalov, v tukovom tkanive

v okolí adipocytov, v blízkosti buniek centrálného nervového systému či mozgových kapilár. Všade poskytujú najmä štrukturálnu podporu a regulujú bunkové správanie.

2.2.1 Štruktúra a kompozícia bazálnej membrány

Kompozícia bazálnej membrány nie je jednotná. Odlišuje sa v závislosti od typu tkaniva, v rámci jedného tkaniva sa líši v rôznych štádiách vývoja a taktiež počas remodelácie ako napríklad pri obnove tkanív. Biochemické zloženie a rôznorodosť dáva tkanivám ich špecifickosť a na základe tohto poznatku by bolo možné zistiť, do akej miery sú funkcie jednotlivých tkanív ovplyvnené mikroprostredím, ktoré ich obklopuje.

V súčasnej dobe existuje mnoho typov proteínov, ktoré sú súčasťou bazálnej membrány. Hoci kolagén typu I je najrozšírenejší a najhojnejšie zastúpený kolagén v tele, v bazálnej membráne je to inak. Tam predstavuje kolagén typu IV 50 % alebo viac podľa toho, o aký orgán sa jedná. Práve kolagén typu IV bol ako prvý chemicky analyzovaný a čoskoro pribudol laminín, ktorý patrí do skupiny glykoproteínov a je to hlavný komponent bazálnej membrány nekolagénového typu. Medzi ďalšie dôležité súčasti BM patria typy proteoglykánov nazývané heparán sulfát, fibronektín, perlekán a entaktín známy tiež ako nidogén. Kvantitatívne menej zastúpené zložky BM sú agrín, osteonektín a fibulín, ktoré sa nachádzajú v špeciálnych typoch BM. Tiež boli nájdené kolagény typu XV, XVIII a XIX.

Bazálna membrána má charakter trojrozmernej siete, ktorá vzniká v dôsledku početných interakcií medzi jej molekulami. Dve polymérne siete tvorené kolagénom typu IV a laminínom sú navzájom poprepájané prostredníctvom entaktínu/nidogénu. Aj ostatné zložky bazálnej membrány môžu medzi sebou interagovať a tak zlepšovať jej súdržnosť. Niektoré súčasti bazálnej membrány budú detailnejšie popísané v ďalších statiach.

Kolagén typu IV

Existuje mnoho typov kolagénov, ktoré tvoria početnú rodinu proteínov. Sú veľmi dôležité pre udržiavanie celistvosti štruktúry všetkých tkanív. Ako už bolo spomenuté, všetky kolagény sa vyznačujú štruktúrou trojitej skrútkovice (triple-helix), ktorá je zložená z troch ľavotočivých polypeptidových reťazcov α . V konečnom

dôsledku je však výsledná trojitá skrutkovica pravotočivá a meria 300 nm na dĺžku a 1,5 nm na šírku. Medzi reťazcami sú vytvorené vodíkové mostíky, vďaka ktorým je kolagén viac stabilný. Jednotlivé polypeptidové reťazce sa skladajú približne z 1400 aminokyselín, pričom každá tretia z nich je glycín.

V reťazcoch sa stále opakujú sekvencie Gly-X-Y, v ktorých X a Y predstavujú zvyšky prolínu a hydroxyprolínu. Vďaka týmto aminokyselinám je výsledné vlákno kolagénu veľmi odolné, pretože reťazce sa môžu obtočiť okolo seba navzájom. Vlákna však nie sú úplne celistvé a v rôznych typoch kolagénu môžeme nájsť v istých miestach reťazca aj prerušenia pravidelnej sekvencie.

V súčasnosti poznáme až 28 typov kolagénu, pričom kolagén typu I je v tele najrozšírenejší, ale v bazálnej membráne je najviac zastúpený kolagén typu IV. Tento typ kolagénu izoloval prvýkrát v roku 1966 Kefalides a bol získaný z časti bazálnej membrány renálneho glomerulu. Kolagén typu IV má niekoľko izoform, ktoré sa navzájom od seba líšia polypeptidovými reťazcami a všetky podtypy kolagénu IV tvoria tiež rodinu proteínov. Tieto podtypy kolagénu IV u cicavcov sú kombináciou troch α -reťazcov, pričom existuje 6 typov reťazcov α ($\alpha 1 - \alpha 6$). Tieto izoformy kolagénu IV sú vo svojej primárnej štruktúre homologické na 50 – 70 %. Na základe ich vzájomnej podobnosti ich delíme do dvoch tried:

- 1. trieda – patria tu reťazce, ktoré vykazujú značnú podobnosť s reťazcom $\alpha 1(IV)$; sú to $\alpha 3(IV)$ a $\alpha 5(IV)$
- 2. trieda – reprezentujú ju reťazce, ktoré sú viac podobné reťazcu $\alpha 2(IV)$; patria sem $\alpha 4(IV)$ a $\alpha 6(IV)$

Štruktúra kolagénu typu IV sa od ostatných líši v tom, že obsahuje cysteín a väčšie množstvo hydroxyprolínu a hydroxylyzínu. Jeho štruktúra je charakterizovaná tromi doménami: N-terminálna 7S doména, C-terminálna globulárna doména (NC1) a centrálna trojitá skrutkovica s krátkymi prerušeniami spôsobujúcimi jej pružnosť (Gelse et al. 2003). Trojskrutkovicová časť je so svojou dĺžkou 1400 aminokyselín najdlhšou z nich a medzi opakujúcimi sa tripletmi Gly-X-Y sa nachádza 22 krátkych sekvencií, ktoré ich prerušujú. Doména NC1 naproti tomu obsahuje len 230 aminokyselinových zvyškov.

Gény, ktoré kódujú rôzne α -reťazce kolagénu typu IV, sa u cicavcov nachádzajú na chromozómoch v pároch, čiže sú na troch rôznych chromozómoch. Reťazce $\alpha 1$ a $\alpha 2$ sú kódované génmi COL₄A₁ a COL₄A₂ a tie sú na chromozóme 13q34. Na chromozóme 2q36-37 sú gény COL₄A₃ a COL₄A₄ kódujúce reťazce $\alpha 3$ a $\alpha 4$ a gény COL₄A₅ a COL₄A₆, ktoré kódujú reťazce $\alpha 5$ a $\alpha 6$, sú na chromozóme Xq22.

Vďaka tomu, že kolagén typu IV má 6 typov reťazcov a vždy sú v kombinácii 3 z nich, je možné vytvoriť až 56 kombinácií molekúl so štruktúrou trojitej skrutkovice a tá sa nazýva protomér. No v tele cicavcov sa napriek tomu tvoria len tri konkrétne typy protomérov. Sú to $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ a $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(\text{IV})$.

Stavba protomérov kolagénu z jeho monomérov je zložitý a špecifický proces, v ktorom hrá veľmi dôležitú úlohu NC1 doména. Výstavba jednotlivých trimérov začína vtedy, keď tri NC1 domény vyvolajú zatiaľ neznáme molekulárne interakcie medzi tromi α -reťazcami. Trimerizácia protoméru postupuje z C-konca a končí ako plne zostavený protomér. Vzniknutý protomér je flexibilný a môže sa viazať na mnoho bodov v molekule, ktoré prerušujú trojitú skrutkovicu. Ďalším krokom v tvorbe je formácia diméru kolagénu typu IV. Dva protoméry kolagénu IV sa spájajú svojimi NC1-trimérmi a formujú NC1-hexamér. Následne interagujú 4 protoméry v oblasti glykosylovanej amino-terminálnej domény 7S, aby vytvorili tetramér. Tieto interakcie vytvárajú jadro pre kostru kolagénu typu IV. Kostra sa potom vyvíja do supraštruktúry kolagénu IV pomocou spojení medzi koncami a tiež pomocou bočných spojení medzi protomérmi kolagénu typu IV (Kalluri, 2003). Počas procesu výstavby vznikajú rôzne väzby ako disulfidické mostíky či iné neredukovateľné spojenia. Štyri domény 7S sú tiež stabilizované disulfidickými mostíkmi alebo kovalentnými väzbami.

Doména NC1 je teda obzvlášť dôležitá v tomto procese, pretože prostredníctvom spojenia NC1-domén dvoch molekúl (trimerických) vzniká hexamér, a taktiež sú NC1-domény zodpovedné za výber reťazcov pri výstavbe.

NC1-doména môže byť od molekuly kolagénu IV oddelená pomocou bakteriálnej kolagenázy. Tak vzniknú monomerické a dimerické podjednotky. Jednotlivé podjednotky ako aj ich vlastnosti sa líšia medzi bazálnymi membránami navzájom.

Tri typy protomérov, ktoré vznikajú v organizme, sa navzájom spájajú, čím vytvárajú tri typy kolagénových sietí. Sú to $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ - $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$, $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ - $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ a $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ - $\alpha5\alpha5\alpha6(\text{IV})$. Sieť typu $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ - $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ sa nachádza v každej bazálnej membráne, no zvyšné dva typy majú svoj výskyt v tkanivách viac obmedzený a sú len v niektorých orgánoch tela. V bazálnej membráne renálnych tubulov a glomerulu, v pľúcach, semenníkoch, prostate, slimákovi ucha (cochlea) a očiach môžeme nájsť sieť typu $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ - $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ a v pokožke, pažeráku, hladkom svali a časti obličiek je prítomná sieť typu $\alpha1\alpha1\alpha2(\text{IV})$ - $\alpha5\alpha5\alpha6(\text{IV})$ (Hudson et al. 2003).

Laminíny

Laminíny predstavujú veľmi dôležitú skupinu proteínov bazálnej membrány a extracelulárnej matrix a ovplyvňujú rôzne procesy bunky ako je diferenciácia, adhézia, pohyb a prežívanie. Ich najdôležitejšou funkciou je však účasť na morfogénzii tkanív, orgánov a pri celkovom vývoji organizmu. Patria do skupiny glykoproteínov, ktoré sa vyskytujú takmer vo všetkých tkanivách a poskytujú štrukturálnu podporu. Sú vo forme trimérov, pretože sa skladajú z troch polypeptidových reťazcov (α , β , γ) a vzájomne sa prepájajú pomocou disulfidických mostíkov. Takto poprepájané sa môžu viazať na molekuly ECM alebo na inú membránu. Ich výsledná štruktúra pripomína svojim tvarom križ a tvorí tzv. ramená, pričom tri z nich sú krátke a jedno je dlhé a líšia sa svojou schopnosťou viazať sa na rôzne komponenty tkanív. Krátke ramená sa viažu na ďalšie molekuly laminínu a tak je možné vytvárať laminínové vrstvy, pričom dlhé rameno ukotvuje túto molekulu na bunke vďaka väzbe s membránou.

Každý ich polypeptidový reťazec sa skladá z viac ako 1500 aminokyselín a môže vzniknúť až 60 rozdielnych izoformami laminínu vďaka rôznym kombináciám reťazcov. Existuje totiž 5 typov α -reťazcov, 4 typy β a 3 typy reťazcov γ . U cicavcov však bolo nájdených len 15 z nich a najznámejšie a funkčne najdôležitejšie sú laminíny 1-11 (dnes označované trojčíslicmi ako napríklad laminín-511 zložený z reťazcov $\alpha5$, $\beta1$ a $\gamma1$). Rôzne typy laminínu sa nachádzajú v rôznych typoch tkanív. Pre epiteliálne bunky je charakteristický laminín-1, pre nervové bunky a svaly je to laminín-2 a v cievach môžeme nájsť laminíny 5, 8 a 10.

Laminins 1 & 3

Laminins 2 & 4

Laminins 10 & 11

Laminin 5

Laminins 6 & 7

Laminins 8 & 9

20

Sú známe mnohé funkcie a aktivity laminínu, ale môžeme ich rozdeliť do dvoch hlavných skupín:

- interakcie krátkych ramien s ostatnými molekulami ECM ako je napríklad nidogén, ktoré zabezpečujú tvorbu a montáž extracelulárnej matrix
- interakcie domén α -reťazca s bunkovým povrchom, najmä s glykolipidmi, proteoglykánmi a glykoproteínmi, ktoré plnia funkciu receptorov

Proteoglykány

Proteoglykány patria do skupiny glykoproteínov a skladajú sa z proteínového jadra a naň kovalentne pripojených glykozaminoglykánov (GAG), ktoré sú špeciálnym typom polysacharidov. Glykozaminoglykány sú lineárne nerozvetvené polyméry tvorené opakujúcimi sa disacharidovými jednotkami. Tie sú tvorené kyselinou urónovou (v prípade keratán sulfátu hexózou) a hexozamínom. GAG sa delia na základe svojej štruktúry a modifikácií jednotlivých zložiek do štyroch skupín: hyaluronán; keratán sulfát; chondroitín sulfát a dermatán sulfát; heparín a heparán sulfát.

Vďaka obsahu karboxylovej alebo sulfátovej skupiny, ktorá je súčasťou aspoň jedného cukru disacharidu, majú proteoglykány záporný náboj a sú vysoko hydrofilné. Preto sú schopné zadržiavať katióny ako Na^+ či K^+ a tým aj vodu a taktiež je vďaka nim bazálna membrána selektívne priepustná v závislosti od náboja.

V organizme plnia proteoglykány okrem hydrodynamickej funkcie aj mnoho ďalších. Napríklad dekorín nachádzajúci sa hlavne v spojovacom tkanive reguluje tvorbu kolagénových vlákien a ovplyvňuje aktivitu TGF- β (Transforming Growth Factor). Perlekán, ktorý reprezentuje skupinu heparán sulfátov a nachádza sa v glomerulárnej bazálnej membráne, zasahuje do selektivity glomerulárnej filtrácie. Taktiež udeľujú elasticitu rôznym tkanivám a interakciami s proteínmi matrix sa podieľajú na stavbe ECM.

Prvým identifikovaným proteoglykánom bol perlekán, ktorý patrí do skupiny heparán sulfátov. Syntetizujú ho bunky hladkých svalov, fibroblasty, chondrocyty či epidermálne a endoteliálne bunky a nachádza sa v koži, srdci, hypofýze, thyme,

prostate, pľúcach, uchu, obličkách alebo v placente. Okrem perlekánu existujú aj ďalšie typy heparán sulfátov ako napríklad agrín nachádzajúci sa v pečeni, štítnej žľaze, pľúcach či obličkách.

Entaktín/nidogén

Entaktín, ktorý je známy tiež ako nidogén, predstavuje rodinu proteoglykánov nachádzajúcich sa v bazálnej membráne. Vďaka svojej schopnosti interagovať s inými komponentami ECM sa podieľa na jej vzniku. Siete tvorené laminínmi a kolagénmi sú navzájom spojené práve prostredníctvom entaktínu. Môže sa však spájať do komplexov aj s perlekánom a fibulínom alebo reagovať s povrchom bunky.

2.2.2 Stavba bazálnej membrány

Stavba bazálnej membrány zahŕňa niekoľko procesov, ktoré na seba nadväzujú a tvoria tak niekoľko po sebe idúcich krokov. Najprv sa musia vytvoriť jej jednotlivé komponenty a v niektorých prípadoch najprv podjednotky tvoriace tieto komponenty. Následne sú ako aktívne molekuly prepravované von z bunky do extracelulárneho priestoru, kde podstupujú ďalší krok, v ktorom adherujú na cieľové povrchy buniek. Potom sa začína tzv. samovýstavba extracelulárnej supramolekulárnej štruktúry, počas ktorej prebiehajú hlavne deje ako polymerizácia jednotlivých súčastí či tvorba väzieb medzi komponentmi ECM. Dochádza však aj k odstraňovaniu vzniknutých komponentov a to najmä počas remodelácie tkanív. Chyba v ktoromkoľvek kroku výstavby vedie k nekompletnému výsledku. V prípade, že chýba dôležitá súčasť bazálnej membrány ako je entaktín/nidogén, perlekán či kolagén IV, vznikne síce spočiatku matrix podobná BM a je schopná vykonávať isté funkcie bazálnej membrány, ale nie je kompletná štrukturálne ani funkčne.

Laminíny a kolagén typu IV sú schopné sa sami od seba spojovať do polymérov a následne tvoriť vrstvy. Naopak, entaktín/nidogén ani proteoglykány tohto procesu schopné nie sú. Navyše bolo zistené, že bez prítomnosti laminínu nedochádza k tvorbe bazálnej membrány, pretože polymerizácia laminínu na povrchu bunky je krok, ktorý iniciuje celý proces tvorby BM. Polyméry laminínu totiž plnia funkciu tzv. lešenia, vďaka ktorému sa môžu prijímať ďalšie komponenty.

Bazálna membrána je zložená z dvoch sietí polymérov. Je to kolagénová a laminínová sieť a navzájom sú poprepájané a premostené prostredníctvom entaktín/nidogénu a perlekánu. Ako bolo už spomenuté, najprv sa musia vytvoriť komponenty bazálnej membrány vo vnútri bunky a to v Golgiho aparáte. Vytvorené protoméry kolagénu typu IV, heterodiméry laminínu a perlekánu s entaktín/nidogénom sa transportujú do mimobunkového priestoru. Tam už začína kľúčový proces polymerizácie laminínu, ktorý sa prostredníctvom sulfatidov viaže na membránu bunky. Keď je sieť hotová, môžu sa na ňu pripojiť ostatné komponenty.

Na to, aby mohli súčasti bazálnej membrány vykonávať aj svoju signalizačnú funkciu, potrebujú sa viazať na transmembránové receptory bunky. Najdôležitejšie sú dva z nich – dystroglykán a integríny.

2.2.3 Funkcie bazálnej membrány

Ako bolo načrtnuté a spomenuté v predošlých statiach, bazálna membrána plní mnoho funkcií. Je dôležitá pri zabezpečovaní a udržiavaní štruktúry tkanív a tiež sa zúčastňuje ich kompartmentalizácie, čiže procesu tvorby jednotlivých kompartmentov, oddelení. Tiež ovplyvňuje proliferáciu buniek ako aj ich migráciu a diferenciáciu a prostredníctvom rastových faktorov riadi tieto funkcie bunky a tiež jej vývoj. Súčasti bazálnej membrány môžu tieto procesy riadiť v zmysle ich inhibície aj aktivácie. Navyše, v niektorých orgánoch pôsobí ako semipermeabilná membrána, ktorá selektívne riadi tok molekúl ako je tomu v pľúcach a obličkách cicavcov. V týchto orgánoch je štruktúra bazálnej membrány veľmi podobná a funguje ako filter vzduchu počas dýchania a filter krvi počas glomerulárnej filtrácie.

Významným procesom bazálnej membrány je jej remodelácia, ku ktorej dochádza pri poškodení tkanív a následnom hojení alebo pri patologických procesoch ako je napríklad vznik a rozvoj astmy. Pri remodelácii bazálnej membrány dochádza teda k jej prestavbe, pričom sa nanovo tvoria nové proteíny a siete, ktoré sú jej súčasťou. V dôsledku ukladania kolagénu v retikulárnych vrstvách bazálnej membrány dochádza aj k jej zhrubnutiu.

V bazálnej membráne sa tiež nachádza mnoho rastových faktorov, ktoré sú aktívne najmä počas procesu remodelácie a tak ovplyvňujú aj správanie buniek. Je to

napríklad VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), faktor, ktorý podporuje rast nových krvných vlásočníc (angiogézu), čo je dôležitý proces pri remodelácii tkanív, ale aj pri chronickom zápale a tvorbe tumorov. Naopak, proti tvorbe nových vlásočníc a tým aj proti tvorbe nádorov pôsobia NC₁ domény kolagénu typu IV, ktoré sú z neho odštepované proteolýzou práve počas remodelácie. Rastové faktory a komponenty bazálnej membrány hrajú teda významnú rolu v procese remodelácie jednak vo fyziologických procesoch, ale aj v tvorbe nádorov a patogenéze.

2.3 Anatómia a fyziológia pľúc

2.3.1 Dýchací systém

Dýchací systém je pre existenciu organizmu životne dôležitý a predstavujú ho rôzne anatomické štruktúry spolu s pľúcami. Vďaka respiračnému systému je organizmus zásobovaný kyslíkom, bez ktorého bunky odumierajú a nenávratne sa poškodzujú. Mozog spolu so srdcom sú na bezkyslíkový stav náchylnejšie a bez prísunu vzduchu sú schopné prežiť len niekoľko minút. Vďaka kyslíku sú bunky schopné vykonávať svoje funkcie, rásť, regenerovať sa, metabolizovať látky a produkovať energiu.

Vzduch však musí do tela prenikáť vo forme a množstve, ktoré je pre telo vhodné. Preto sa už pri nádychu vzduch zvlhčuje, otepľuje a čiastočne čistí. Dýchaním sa získava kyslík a odstraňuje oxid uhličitý, ktoré sa do tkanív či von z nich dostávajú vďaka obehovému systému. Respiračný systém je tvorený dýchacími cestami a pľúcami, pričom dýchacie cesty majú za úlohu transport vzduchu a výmenu plynov medzi telom a vonkajším prostredím a v pľúcach dochádza k distribúcii plynov do jednotlivých orgánov a tkanív prostredníctvom krvi.

Horné dýchacie cesty tvoria nos a hltan a na ne nadväzujú dolné dýchacie cesty tvorené hrtanom, priedušnicou a pľúcami a funkčnou jednotkou respiračného systému sú pľúcne mechúriky – alveoly nachádzajúce sa v každom pľúcnom laloku. Vzduch teda postupuje cez nos do hltanu, hrtanu a priedušnicou (*trachea*) do pľúc.

Pľúca sú na svojom povrchu pokryté popľúcnicou (*pleura*), ktorá ich chráni a tiež im uľahčuje pohyb. Ľavá a pravá strana pľúc sa však líšia kvôli umiestneniu srdca na ľavej strane. Pravé pľúca sú teda zložené z troch lalokov a ľavé len z dvoch. Ďalej sa delia aj jednotlivé laloky na menšie lalôčky navzájom od seba oddelené spojovacím tkanivom. Trachea ústiaca do pľúc sa za hrudnou kosťou rozvetvuje na dve časti, priedušky, pričom každá vstupuje do inej strany pľúc. Tie sa delia ešte na sekundárne priedušky, ktoré sa následne rozvetvujú na priedušničky rôznej veľkosti. Nazývajú sa terminálne a ďalej pokračujú ako respiračné priedušničky a na ich konci sa nachádzajú alveolárne kanáliky ústiace do alveolárnych váčkov. Každý tento váčok je tvorený dvoma až troma pľúcnyimi mechúrikmi. Tie sú bohato popretkávané krvnými

vlásočnicami, aby mohli plniť svoju funkciu a vymieňať tak plyny medzi nimi a krvou a preto je aj ich stena veľmi tenká.

2.3.2 Alveola a bazálna alveolo-kapilárna membrána

Ako bolo spomenuté, pľúcne mechúriky sú funkčnou jednotkou pľúc a práve v nich dochádza k výmene plynov medzi alveolami a krvnými vlásočnicami, čiže na alveolo-kapilárnej membráne. Aby mohli alveoly správne vykonávať svoju funkciu, potrebujú byť pružné. Práve preto obsahujú elastické a kolagénové vlákna, ktoré im dovoľujú rozťahnuť sa pri nádychu a vrátiť sa do pôvodného tvaru a rozmerov po výdychu.

Stena pľúcnych mechúrikov sa skladá z troch hlavných typov buniek, pričom každý z nich má špecifickú funkciu. Sú to pneumocyty I. typu, pneumocyty II. typu a makrofágy. Stavebnou jednotkou alveol sú pneumocyty I. typu, nazývané tiež malé alveolárne bunky a zabezpečujú štruktúru stien mechúrikov. Sú to ploché a malé epiteliálne bunky, no kvantitatívne viac zastúpené ako ostatné typy. Cez ich cytoplazmu obsahujúcu sploštené jadro difundujú plyny medzi pľúcnymi mechúrikmi a vlásočnicami. Pneumocyty I. typu tvoria 95 % alveolárneho povrchu a zvyšných 5 % pripadá pneumocytom II. typu, ktoré sa tiež nazývajú veľké alveolárne bunky a sú rozptýlené medzi malými. Tento typ buniek je dôležitý najmä kvôli svojej sekrécnej schopnosti, pretože produkujú surfaktant nevyhnutný pre správne fungovanie pľúc. Znižuje totiž povrchové napätie tekutiny pokrývajúcej vnútorný povrch pľúc a zabraňuje tak pľúcnemu kolapsu. Veľké alveolárne bunky sú potrebné aj pri poškodení alveol, pretože sú schopné regenerácie endotelu tým, že sa rýchlo delia a môžu nahradiť aj pneumocyty I. typu. Posledným dôležitým typom buniek sú spomínané makrofágy s obrannou funkciou schopné fagocytovať cudzorodé častice vzduchu či baktérie.

Bariéra, ktorá selektívne riadi prechod plynov medzi vlásočnicami a mechúrikmi sa nazýva alveolo-kapilárna membrána. Tvoria ju pneumocyty I. typu, pod nimi ležiaca alveolárna bazálna membrána, endoteliálne bunky kapilár a tiež bazálna membrána k nim prislúchajúca. Alveolo-kapilárna membrána má však štruktúru trojitej vrstvy, pretože pneumocyty I. typu a endotel sú k sebe orientované svojimi bazálnymi membránami a tie spolu splývajú. Hrúbka bazálnej membrány, ktorú zdieľajú bunky

epitelu aj endotelu, sa pohybuje v rozmedzí 50-100 nm. Najdôležitejšími stabilizujúcimi prvkami pľúc sú surfaktant, pľúcny obeh a spojovacie tkanivo, ktoré vytvára medzialveolárne prepážky. Alveolárna bazálna membrána (ABM) obsahuje rovnako ako iné typy BM kolagén typu IV, laminín, entaktín 1, kolagén typu V a proteoglykány chondroitín sulfát a heparán sulfát. Glykozaminoglykány sa sústreďujú na jednej strane bazálnej membrány a regulujú jej priepustnosť. Tieto komponenty sa v ABM nachádzajú aj počas vývoja organizmu a aj v dospelosti.

2.3.3 Zmeny bazálnej membrány

Bazálna membrána hrá veľa dôležitých úloh v organizme a v tkanivách sa zúčastňuje ich diferenciácie, remodelácie či údržby. Aby mohla správne vykonávať svoje funkcie, potrebuje byť v optimálnom stave, so správnou štruktúrou a kompozíciou. Narušenie jej vlastností sa odzrkadlí aj v narušení jej funkcií, čo môže mať za následok vznik rôznych chorôb a to najmä pľúcnych a renálnych ako napríklad chronická obštrukčná pľúcna choroba, tuberkulóza, ale môže sa to prejavovať aj u pacientov po transplantácii. K celkovej zmene bazálnej membrány dochádza v dôsledku mnohých procesov. Membrána hrubne a rastie, ukladajú sa v nej ložiská kolagénu, môže sa vrstviť (lamelovať) alebo vytvárať prerušenia vo svojej štruktúre.

Jedným z ochorení, ktoré je typické zmenenou bazálnou membránou, je astma. Jej hrúbka u astmatických pacientov je výrazne väčšia a ukladajú sa v nej proteíny extracelulárnej matrix, najmä kolagény a laminín. Tento jav bol zistený aj u iných pľúcnych chorôb ako je obštrukčná pľúcna choroba alebo idiopatická pľúcna fibróza. Zhrubnutie alveolárnej bazálnej membrány negatívne ovplyvňuje pľúcne funkcie, parametre ventilačnej perfúzie a dochádza k poškodeniu pľúc. Elektronovou mikroskopiou bolo zistené zhrubnutie membrány až o 50 %. Zaujímavé je, že vrstva BM nazývaná *lamina lucida* sa nemení a ide teda hlavne o zväčšenie vrstvy *lamina densa*. Zahusťovanie bazálnej membrány je pomalý, ale plynulý proces súvisiaci so zhoršovaním choroby. U spomenutej idiopatickej pľúcnej fibrózy, ktorá je považovaná za autoimunitnú chorobu, bola pozorovaná lamelácia bazálnej membrány a jej veľmi výrazné, až 6-násobné zhrubnutie.

Zhrubnutie bazálnej membrány v obličkách je tiež častým javom pri rôznych chorobách. Tak je tomu napríklad u diabetických pacientov, pretože diabetes mellitus

ovplyvňuje a mení funkcie organizmu na mnohých úrovniach a v rôznych oblastiach. Postihuje najmä cievny a nervový systém, retinu či glomerulárnu filtráciu. Aj u diabetických pacientov však boli zistené okrem zhrubnutej glomerulárnej bazálnej membrány aj zmeny na bronchiálnej a alveolárnej BM. Ďalší celkom bežný typ glomerulonefritídy je tzv. membránová glomerulonefritída charakteristická svojou zhrubnutou membránou. Existujú však aj choroby, kde je to naopak a vyznačujú sa stenčenou bazálnou membránou ako napríklad u choroby tenkej bazálnej membrány (typ nefropatie; Thin basement membrane disease).

2.4 Vitamín A

Vitamín A označovaný tiež ako retinol predstavuje látku nevyhnutnú pre správne fungovanie organizmu spolu s ostatnými vitamínmi. Rozpúšťa sa v tukoch a má niekoľko biologicky aktívnych foriem. Sú to retinol, retinal a kyselina retinová. Do tela sa potravou dostávajú vo forme esterov alebo prekursorov nazývaných karotenoidy a v tele sú spracovávané na výsledné produkty.

Veľmi dôležitý je najmä pre správne fungovanie sietnice, pretože zrkové pigmenty rodopsín a iodopsín sa tvoria práve z neho. Taktiež je nutný pre správny rast kostí, epiteliálneho tkaniva, pre reprodukciu či vývoj embrya. Je to tiež dôležitý antioxidant a chráni sliznice pred rôznymi infekciami. Spolu s ostatnými vitamínmi podporuje imunitný systém a môže zmierňovať následky či prejavy niektorých chorôb.

Naopak, jeho nedostatok spôsobuje rôzne zmeny a poškodenia funkcií organizmu. Spôsobuje hlavne šeroslepotu, zhoršenie kvality kože prejavujúce sa tvorbou šupiniek či rohovatením, spomalí sa pohlavný vývoj a pohlavná aktivita, imunita je znížená a dochádza k častým zápalom.

2.4.1 Karotenoidy a retinoidy

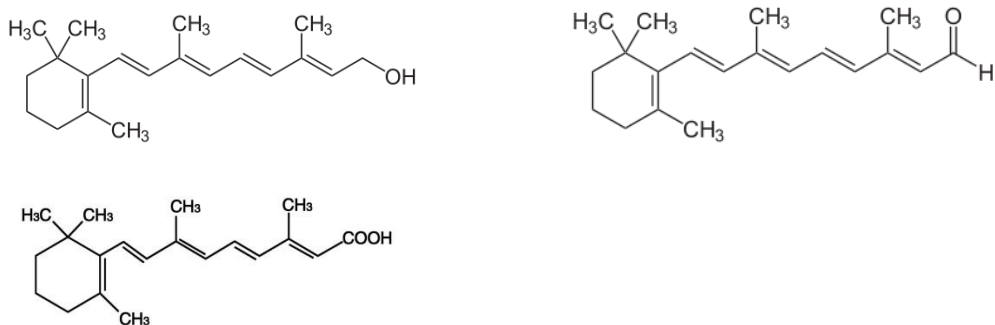
Karotenoidy sú organické farbivá s antioxidačnou funkciou, ktorým farbu dodávajú početné dvojité väzby v ich štruktúre. Vďaka týmto dvojitým väzbám môžu vytvárať *cis*- a *trans*- izoméry. Vyskytujú sa však najmä v konfigurácii *all-trans*. Na základe svojej farby sa delia do dvoch skupín – sú to karotény sfarbené do červeno-oranžova a xantofyly žltej farby. Existuje mnoho zástupcov karotenoidov, ktoré sú vo svojej štruktúre veľmi podobné, ale najznámejší predstavitelia sú α -karotén, β -karotén, lykopén, ktoré patria medzi karotény, alebo luteín, zeaxantín a ďalšie patriace medzi xantofyly.

Najdôležitejším a najznámejším z nich je vďaka svojej najväčšej aktivite práve β -karotén označovaný tiež ako provitamín A, pretože je prekursorom vitamínu A. Skladá sa z dvoch cyklických častí spojených konjugovaným systémom dvojitých väzieb, tzv. izoprénovým kmeňom (viz. obr. č. 3). Táto štruktúra sa môže štiepiť buď symetricky alebo asymetricky. Pri symetrickej reakcii sprostredkovanej enzýmom *beta, beta-carotene-15,15'-dioxygenasa* vznikajú dve molekuly retinaldehydu (retinalu)

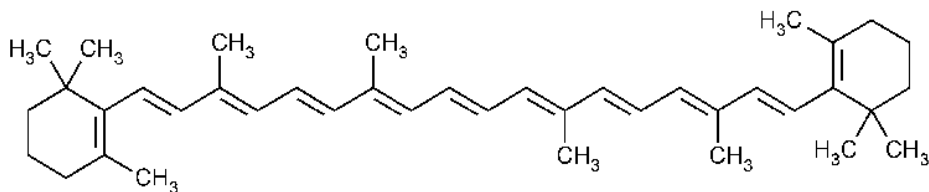
a z nich následnou redukciou molekuly retinolu. U človeka je aktivita tohto enzýmu nízka a preto je na získanie 1 mg retinolu potrebných 6 mg betakaroténu. Asymetrická reakcia nie je tak významná, pretože dochádza k značnému poklesu v produkcii retinolu, ktorý vzniká sledom reakcií s medziproduktom β -apokarotenalom.

Retinoidy sú deriváty vitamínu A a ich štruktúra je veľmi podobná. Niektoré z nich sú zlúčeniny prírodného charakteru, iné boli získané synteticky. Delíme ich do troch generácií. Prvú z nich tvorí retinol, retinal, tretinoín (kyselina retinová), alitretinoín a isotretinoín. Druhá generácia je zastúpená etretinátom a acitretínom a poslednú z nich tvoria bexarotén, adapalén a tazarotén.

Vitamín A (tzv. *all-trans* retinol) je štruktúra, z ktorej sú odvodené ostatné prirodzené retinoidy. Je to primárny alkohol zložený z izoprénových jednotiek. Štyri tieto jednotky sa spájajú tak, že vytvárajú nearomatický cyklus s bočným polyizoprénovým (polyénovým) reťazcom, ktorý je zakončený hydroxylovou skupinou. Zmeny na tejto štruktúre ako napríklad zámena koncovej skupiny či zmeny postranného reťazca dávajú vznik ďalším retinoidom. Napríklad v prípade retinalu je koncová hydroxylová skupina nahradená aldehydickou a u kyseliny retinovej zas karboxylovou skupinou. Detailné štruktúry vybraných retinoidov sú uvedené na obr. č. 2.



Obrázok 2: Štruktúra retinolu, retinaldehydu a kyseliny retinovej



Obrázok 3: Štruktúra betakaroténu

2.4.2 Absorpcia, transport a metabolizmus vitamínu A

Všetky vitamíny sú látky, ktoré si telo nevie nasyntetizovať samo a do tela sa dostávajú len prostredníctvom potravy. Tak je to, samozrejme, aj s vitamínom A, ktorý sa v potrave nachádza buď ako provitamín A vo forme karotenoidov, alebo ako hotový retinol či kyselina retinová alebo ich estery. Bohatým zdrojom tohto vitamínu je zelenina ako mrkva, melón, špenát, brokolica ale tiež ovocie ako marhule a dokonca aj mlieko, mliečne výrobky, vajíčka či mäso.

Absorpcia vitamínu A prebieha v črevách, kde sa vstrebáva až 70-90 % prijatého množstva. Proces absorpcie je celkom rýchly a za dve až šesť hodín po prijatí vitamínu A je rýchlosť najvyššia. Retinol rovnako ako betakarotén sú vstrebávané bunkami črevnej mukózy, no betakarotén musí najprv podstúpiť niekoľko zmien. Enzymatickým trávením sa premieňa na retinal a ten je reduktázou spracovaný na retinol. Takto spracované produkty vytvoria estery zabudované do chylomikrónov, ktoré ich transportujú ďalej do tela.

Transport vitamínu A začína prechodom chylomikrónov do lymfatického systému a následne do krvného obehu. Chylomikróny okrem esterov retinolu viažu a transportujú aj voľný retinol, karotenoidy a triglyceridy. Triglyceridy však opúšťajú túto transportnú jednotku v extrahepatálnych bunkách a vitamín A stále viazaný v chylomikrónoch putuje do pečene, kde sa metabolizuje a uskladňuje. Dopravené estery retinolu sa hydrolyzujú a tiež ukladajú. V čase potreby retinol opúšťa pečeň a do cieľového miesta sa dostáva vďaka špeciálnemu prenášaču, proteínu, ktorý retinol viaže (RBP, Retinol Binding Protein). Tento proteín slúži na transport *all-trans* retinolu, ktorý tvorí približne 90 % vitamínu A v plazme. V krvi sa RBP spolu s retinolom spájajú s transthyretínom (TTR) a vytvárajú transportný komplex retinol-RBP-TTR. Bunky si teda môžu vitamín A vyzdvihnúť v čase potreby, pretože tento komplex cirkuluje v tele a nepodlieha glomerulárnej filtrácii.

V tkanivách potom dochádza buď k oxidácii retinolu, pričom najprv reverzibilne vzniká pomocou niekoľkých enzýmov retinal a následne ireverzibilným procesom kyselina retinová. Vo vnútri buniek v blízkosti jadrových receptorov tak už môže vykonávať svoje funkcie. Druhá možnosť je, že sa neskôr retinol inaktivuje reakciou

s glukuronidmi a pripravuje sa tak na vylúčenie. Vylučuje sa prostredníctvom glomerulárnej filtrácie a katabolických reakcií v obličkách.

2.4.3 Antioxidačné a prooxidačné funkcie vitamínu A

Ako bolo spomenuté vyššie, vitamín A spolu s ďalšími retinoidmi a karotenoidmi plní mnoho dôležitých funkcií v organizme, medzi ktorými sa nachádza aj antioxidačná funkcia a to najmä v prípade betakaroténu. Táto schopnosť ničiť voľné radikály, ktoré v tele vznikajú, je dosť dôležitá, pretože veľmi reaktívne radikály môžu poškodzovať proteíny, DNA, karbohydráty či lipidy.

Existujú však rôzne štúdie, v ktorých je dokázaný antioxidačný, ale aj prooxidačný efekt vitamínu A. Dôležité faktory, ktoré rozhodujú, či bude vitamín A pôsobiť ako antioxidant alebo ako prooxidant, sú jeho koncentrácia a taktiež parciálny tlak kyslíka. Keď sa zvýši ktorýkoľvek z nich, prevláda prooxidačná funkcia. Napríklad betakarotén vystupuje ako lapač voľných radikálov len pri tlaku kyslíka, ktorý je výrazne nižší ako 150 torrov. Pri vyšších parciálnych tlakoch kyslíka sa antioxidačná schopnosť betakaroténu stráca a začne sa prejavovať jeho prooxidačný efekt a to obzvlášť pri jeho vyšších koncentráciách. Pri vyššom tlaku kyslíka sa totiž tvorí z betakaroténu peroxylový radikál. Rovnaké schopnosti majú aj iné látky s podobnou štruktúrou, ktoré obsahujú veľa konjugovaných dvojítých väzieb a tieto schopnosti taktiež závisia od tlaku kyslíka.

Antioxidačné vlastnosti vitamínu A a ďalších retinoidov a karotenoidov boli popísané už dávno. V roku 1932 preukázali Monaghan a Schmitt, že betakarotén inhibuje oxidáciu kyseliny linolovej (Burton 1988). Výskumy zamerané na antioxidačné a prooxidačné vlastnosti však pretrvávajú dodnes. Niektoré z nich dokazujú, že vitamín A a prírodné retinoidy vystupujú v reakciách spôsobených voľnými radikálmi ako antioxidanty. Napríklad pri vzniku reaktívnych substancií z kyseliny tiobarbiturovej pôsobia tieto látky proti nim prostredníctvom enzýmov a tiež neenzymatických látok. Je to napríklad enzým NADPH alebo železo či askorbát. Týmto mechanizmom ničia voľné radikály *all-trans*-retinol, retinal, retinyl-acetát, retinyl-palmitát alebo kyselina retinová a to nielen v biologických membránach in vivo, ale aj v rôznych homogenátoch tkanív pečene, nervového systému, srdca, ktoré sú pri výskumnej činnosti získavané z potkanov.

Keďže je vitamín A rozpustný v tukoch, nachádza sa v hydrofóbných častiach biologických membrán. Tam sa zúčastňuje rôznych dejov, napríklad peroxidácie lipidov, v ktorej inhibuje oxidačné reakcie. Tak pôsobí nielen samotný retinol, ale aj jeho deriváty ako retinal, retinyl-palmitát a retinová kyselina, pričom najvýraznejší efekt má retinol a najmenší má kyselina retinová. Veľké množstvo lipidov, hlavne polynenasýtených, sa nachádza v nervovom systéme a preto lipidy tohto systému často podliehajú peroxidácii. Vďaka tomuto javu je aj antioxidačná aktivita retinolu a jeho derivátov vyššia.

Antioxidácia neprebíha len jedným mechanizmom. Buď sú peroxylové radikály stabilizované prostredníctvom polyénových jednotiek antioxidantov, ktoré taktiež zachytávajú redukované formy kyslíka v lipidovej fáze membrán a v lipoproteínoch, pretože tam sa tieto vitamíny vďaka svojej rozpustnosti v tukoch nachádzajú. Alebo dochádza k priamej reakcii medzi antioxidantom a voľnými radikálmi, pričom antioxidanty dotujú tieto radikály atómom vodíka. Tak vzniká radikál antioxidantu, ktorý následne vytvára komplex s pôvodným (napr. lipidovým) radikálom.

Ako bolo spomenuté, antioxidačné vlastnosti nevykazuje len vitamín A, ale aj deshydroretinol a mnoho karotenoidov. Mnohé štúdie preukázali, že karotenoidy, ktoré obsahujú minimálne 11 konjugovaných dvojitéch väzieb vo svojej štruktúre, sú približne 5-krát účinnejšími antioxidantami ako retinol a iné retinoidy. Túto podmienku 11 konjugovaných väzieb spĺňa napríklad betakarotén, luteín, lykopén, zeaxantín či kryptoxantín.

Prooxidačné vlastnosti vitamínu A boli tiež v mnohých štúdiách potvrdené. Pri zvýšenom príjme retinoidov dochádza aj k zvýšenej peroxidácii lipidov. Prooxidačné pôsobenie vitamínu A však závisí od koncentrácie a preto je veľmi dôležité kontrolovať príjem tohto vitamínu. Keď koncentrácia retinolu presiahne hodnotu 7 μM , dochádza k zvýšenej peroxidácii lipidov a vzrastie teda aj aktivita *katalasy* a *ornitíndeskarboxylasy*. Silnejším prooxidačným činidlom ako je retinol je však kyselina retinová, ktorá prudko zvyšuje peroxidáciu lipidov pri koncentráciách vyšších ako 1 μM . Zvýšenú aktivitu *katalasy*, *superoxiddismutasy* a *glutathionreduktasy* môžeme pozorovať už pri jej koncentrácii 0,1 μM .

2.4.4 Retinoidové receptory a ich funkcie

Retinoidové receptory plnia mnoho dôležitých funkcií už pri vývoji organizmu a morfogénéze. Rovnako aj v dospelom organizme ovplyvňujú proliferáciu, diferenciáciu a smrť buniek. Tieto receptory tiež regulujú metabolické dráhy, čím zasahujú do metabolizmu glukózy, cholesterolu a mastných kyselín. Týmto spôsobom ovplyvňujú diabetes II. typu, hyperlipidémiu a aterosklerózu. Špecifická aktivácia retinoidových receptorov úzko súvisí s termogenetickou aktivitou hnedého tukového tkaniva a s citlivosťou buniek na inzulín. Vďaka tomuto javu sú tieto molekuly dôležité pre výskum zameraný na nové lieky na kontrolu obezity.

Rozoznávame dva typy receptorov. Sú to retinoidové X receptory (RXR; Retinoid X Receptors) a receptory pre kyselinu retinovú (RAR; Retinoic Acid Receptors). Oba tieto typy receptorov patria do superrodiny receptorov pre tyroidné/steroidné hormóny. Receptory RAR rovnako ako receptory RXR majú tri typy – α , β a γ . RAR receptory viažu *all-trans*-retinovú kyselinu a tiež *9-cis* retinovú kyselinu, no RXR receptory viažu len *9-cis* izomér. Obe skupiny receptorov vytvárajú homodiméry, ale môžu sa družiť aj medzi sebou a tvoriť tak heterodiméry RXR-RAR. Na to, aby mohla kyselina retinová riadiť génovú transkripciu, musia receptory RAR pre túto kyselinu formovať práve spomínané heterodiméry s RXR receptormi. Bolo zistené, že len tieto heterodiméry efektívne viažu tzv. rozpoznávané DNA sekvencie (DNA recognition sequences), nazývané elementy odpovede kyseliny retinovej (RAREs; Retinoic Acid Response Elements) (Zhang et al. 1992, Kleiwer et al. 1992, Marks et al. 1992, Bugge et al. 1992).

Okrem elementov odpovede kyseliny retinovej (RAREs) existujú aj elementy odpovede retinoidov (RXREs; Retinoid X Response Elements) a oba tieto špecifické segmenty DNA predstavujú časť promotérov génov, ktoré sú regulované kyselinou retinovou. Tento fakt naznačuje, že expresia niektorých génov je regulovaná retinolom.

Existuje mnoho štúdií zameraných na retinoidové receptory a ich aktiváciu. Vo svojich výsledkoch sa však celkom odlišujú. Niektoré z nich ukazujú, že ich aktivácia vedie k bunkovej proliferácii, diferenciácii a počas normálneho vývoja buniek vyvoláva apoptózu. Iné štúdie však naznačujú opak a tvrdia, že vitamín A spolu s jeho metabolitmi apoptózu inhibujú. U tehotných žien dochádzalo k apoptóze placenty a poškodeniam plodu. Retinoidové receptory asi aj naďalej ostanú predmetom

výskumov, pretože účinok retinoidov a aktivácia ich receptorov vedie k rôznym dejom, ktoré sa líšia v závislosti od typu buniek, tkaniva, orgánu, či dokonca organizmu a tiež závisí od podmienok kultivácie. Napríklad v niektorých prípadoch retinoidy aktivujú transkripciu génu kódujúceho reťazce kolagénu typu IV (Espeseth et al. 1989), no v iných jeho syntézu inhibujú.

2.4.5 Úloha vitamínu A v pľúcnych funkciách a ich vývoji

Ako bolo spomenuté v predošlých častiach, vitamín A je pre organizmus nevyhnutný a je veľmi potrebný už počas vývoja plodu, v prenatalnom a tiež neonatálnom období človeka. Retinol a ostatné retinoidy sa podieľajú na vývoji pľúc a tvorbe alveol. Rôzne štúdiá na potkaních pľúcach preukázali, že sa v nich počas vetvenia a rastu dýchacích ciest a pľúc nachádza mnoho receptorov pre kyselinu retinovú. Zásoby vitamínu A v pľúcach sú vysoké, ale postupne počas vývoja sa znižujú, pretože sa využívajú pri morfogenetickej remodelácii pľúc. Aktivita, expresia a počet receptorov pre retinoidy v potkaních pľúcach sa mení pred a po pôrode. Pri nedostatku vitamínu A dochádza k histopatologickým zmenám pľúc (Zachman, 1995).

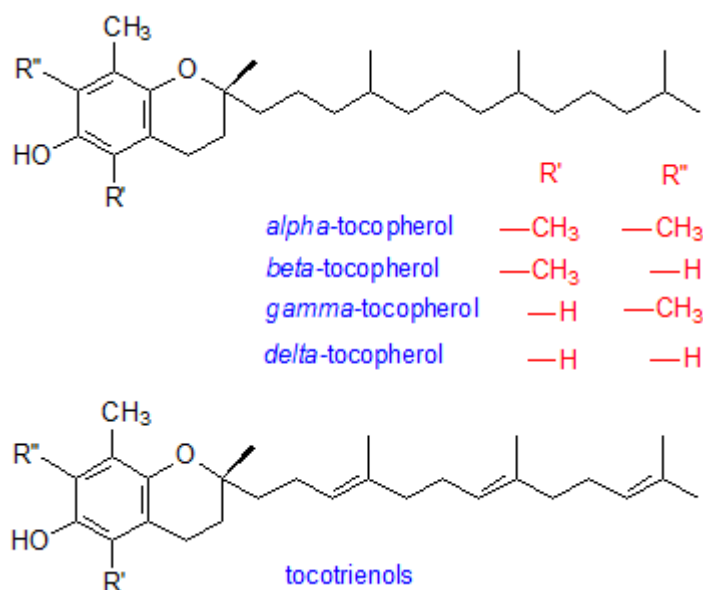
Podávanie vitamínu A počas tehotenstva je veľmi dôležité, pretože retinol stimuluje alveologenézu. Taktiež podporuje regeneráciu pľúcnych mechúrikov pri ich poškodení (napr. pri pľúcnom emfyzéme) a podieľa sa na udržiavaní ich architektúry. V pokusoch na potkanoch bolo zistené, že v posledných štádiách gravidity, keď dozrievajú pľúca, dochádza k poklesu zásob vitamínu A a retinoidov v pľúcach. Je to tak v dôsledku zvýšeného dopytu po kyseline retinovej, ktorá je dôležitá pre dokončenie pľúcneho vývoja a tiež metabolizmus a diferenciáciu buniek. Nízke plazmatické hladiny retinolu boli detegované u predčasne narodených detí, pričom veľmi nízke hladiny vykazovali deti s pľúcnymi poruchami. V iných pokusoch na potkanoch sa zistilo, že u zvierat s nedostatkom vitamínu A dochádzalo k inhibícii proliferácie mukociliárnych buniek, čo viedlo k vzniku metaplastickej priedušnice. Podávaním normálnej stravy sa tieto prejavy zmiernili, alebo úplne zanikli. Retinoidy sú teda veľmi dôležité pre udržiavanie vlastností epitelu a plnia dôležitú úlohu pri regenerácii trachey a bronchopulmonárneho stromu. Udržiavajú správnu morfológiu pľúc priamo aj nepriamo a kyselina retinová sa využíva aj ako liečebný prostriedok pri niektorých

pľúcnych chorobách ako je napríklad pľúcny emfyzém, bronchopulmonárna dysplázia a cystická fibróza. Bolo totiž dokázané, že kyselina retinová iniciuje a podporuje tvorbu menších ale početnejších alveol a tiež priehradok medzi nimi.

2.5 Vitamín E

Vitamín E bol prvýkrát objavený v roku 1922 a v súčasnosti sa pod týmto názvom označuje 8 chemických zlúčenín s veľmi podobnou štruktúrou a biologickou aktivitou. Je to vitamín rozpustný v tukoch a preto sa v tele nachádza v lipofilných štruktúrach ako je napríklad cytoplazmatická membrána alebo lipoproteíny s malou hustotou a hlavne v tukovom tkanive. V týchto miestach tiež vykonáva svoje funkcie a pôsobí najmä ako účinný antioxidant a inhibuje peroxidáciu lipidov. Prijem tohto vitamínu z potravy je pre telo nevyhnutný, pretože si ho nedokáže vytvoriť samo. Nachádza sa predovšetkým v semenách olejovitých plodín ako je sója, orechy, slnečnica a tiež ho obsahujú olivy, kokos či kukurica.

Štruktúra tohto vitamínu je odvodená od dvoch typov zlúčenín. Je to tokoferol a tokotrienol, pričom všetky typy vitamínu E vznikajú rôznymi substitúciami v ich štruktúre. Jedná sa o α -, β -, γ -, δ -tokoferol a α -, β -, γ - a δ -tokotrienol. Základná kostra tokoferolov a tokotrienolov je na obrázku č. 4.



Obrázok 4: Štruktúra tokoferolu a tokotrienolu

Tokoferol a tokotrienol majú veľmi podobnú štruktúru, ktorá sa skladá z heterocyklu nazývaného chromanol a postranného reťazca. V prípade tokoferolu má reťazec 3 chirálne uhliky a môžu tak vznikať rôzne stereoizoméry, pričom najčastejší je *R,R,R*-izomér. Postranný reťazec tokotrienolu je nenasýtený a obsahuje dvojité väzby.

Kľúčovú úlohu v ich stavbe hrá fenolická -OH skupina, pretože práve vďaka nej môže vitamín E pôsobiť ako antioxidant tým, že vodíkom tejto skupiny stabilizuje voľné radikály. Vzniknutý tokoferoxylový radikál sa následne stabilizuje rezonanciou. Tento efekt zvyšujú metylové skupiny nasubstituované na heterocykle. Vďaka obsahu až troch metylových skupín je biologicky najaktívnejší α -tokoferol, ktorý zároveň predstavuje štandard pre porovnávanie účinnosti ostatných zlúčenín zo skupiny vitamínu E. V liekopisoch sa uvádza, že jednu IU (unifikovaná jednotka) tokoferolu tvorí 0,67 mg *RRR*- α -tokoferolu. Tiež býva definovaná ako 1 mg racemickej zmesi všetkých ôsmich typov vitamínu E a nazýva sa *all-rac*- α -tokoferyl acetát. V prepočte však 1 IU racemickej zmesi odpovedá 0,45 mg α -tokoferolu.

Ako bolo spomenuté, antioxidácia prebieha odovzdaním protónu vodíka voľným radikálom $\text{ROO}\cdot$, ktoré vznikajú napríklad z polynenasýtených mastných kyselín fosfolipidov membrán. Vitamín E teda zredukuje tieto voľné radikály za vzniku hydroperoxidov ROOH a tak zabraňuje ich reťazovému šíreniu. Odovzdaním vodíka z α -tokoferolu vznikne z neho α -tokoferoxylový radikál ($\alpha\text{-T}\cdot$), ale ten má obmedzenú možnosť šíriť voľný radikál a stabilizuje sa prostredníctvom rezonancie alebo vďaka iným antioxidantným látkam ako je askorbát, tioly alebo enzymatickými mechanizmami. Tiež sa môžu dva α -tokoferoxylové radikály spojiť navzájom a vytvoriť tak stabilizovaný dimér. Rýchlosť antioxidantnej reakcie závisí od rôznych faktorov, napríklad od stupňa nenasýtenosti mastných kyselín či od dĺžky uhlíkového reťazca.

Vitamín E teda vystupuje v organizme hlavne ako antioxidantný činiteľ a túto funkciu plní najmä v tukovom tkanive, membránach, ale aj v plazme, erytrocytoch a rôznych tkanivách. Tam ničením voľných radikálov bráni peroxidácii lipidov. Najčastejšie voľné radikály spôsobujúce poškodenia organizmu sú hydroxylový, peroxylový, alkoxylový radikál a iné. Miera poškodenia týmito látkami závisí okrem iného práve od množstva prítomného vitamínu E. Preto je dôležitý pri mnohých chorobách ako rakovina a tiež zabraňuje starnutiu organizmu. Tiež preukazuje terapeutický efekt pri ateroskleróze, ktorá vzniká oxidáciou LDL cholesterolu a ten sa následne ukladá vo forme penových buniek a tvorí ateromové pláty, ktoré zužujú cievy. Vitamín E tiež inhibuje *proteínkinasu C*, čím bráni vzniku a rozvoju aterosklerózy. Ovplyvnením aktivity *proteínkinasy C* tiež inhibuje priľnavosť a zhlukovanie

trombocytov ako in vivo, tak aj in vitro. Aj keď tieto vlastnosti vykazujú rôzne typy vitamínu E, α -tokoferol je najúčinnější z nich.

2.5.1 Absorpcia, transport a metabolizmus vitamínu E

Podobne ako vitamín A, aj vitamín E sa do tela vstrebáva črevnou absorpciou. Na to, aby mohol byť vstrebaný, však vyžaduje prítomnosť žlčových kyselín a pankreatických enzýmov ako lipasy či esterasy. Tie štiepia tokoferol prijatý vo forme esterov a žlč slúži na tvorbu micel potrebných na prepravu vitamínu hydrofilným prostredím. V prípade, že chýbajú žlčové kyseliny alebo pankreatické enzýmy, absorpcia vitamínu E je značne znížená. Preto sa deficit tohto vitamínu prejavuje najmä u chorých pacientov trpiacich pankreatitídou, cystickou fibrózou, cholestatickou pečňovou chorobou či obštrukciou žlčovodu. Rovnako ako iné v tukoch rozpustné vitamíny, aj vitamín E potrebuje chylomikróny pre transport a prienik črevnou mukózou a dostávajú sa tak do lymfatického systému a následne do krvi. Množstvo vstrebaného tokoferolu je však malé a predstavuje približne 15-45 % prijatého vitamínu a toto množstvo nezávisí od konkrétneho typu vitamínu E.

V krvi je vitamín E transportovaný prostredníctvom chylomikrónových zbytkov a časť cirkuluje krvným obehom pomocou lipoproteínov, napríklad lipoproteínov s veľkou hustotou (HDL). Z krvi sa dostávajú do pečene všetky prítomné formy vitamínu E. Z nej sa však do tela nedistribuuju rovnakým dielom, ale vylučuje sa predovšetkým *RRR*- α -tokoferol. Aj keď má v krvnom obehu svoj vlastný prenášač nazývaný α -tokoferol prenášajúci proteín (α -TTP, α -Tocopherol Transfer Protein), uprednostňuje sa jeho väzba na lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (VLDL). Z nich sa potom rovnako ako z chylomikrónov uvoľňuje lipolýzou prostredníctvom lipoproteínovej lipázy. V tkanivách sa následne nahrádza tzv. starý α -tokoferol za nový. Väčšinou je tento proces celkom rýchly, ale v niektorých tkanivách a orgánoch ako je mozog, srdce či miecha, prebieha pomaly.

Vitamín E sa vylučuje z tela prostredníctvom žlči, moču, exkrementov a pokožky. Je oxidovaný za vzniku hydrochinónu a následne konjugovaný a tvorí tak glukuronáty. Tie sa vylučujú žlčou, alebo podliehajú ďalším reakciám v ľadvinách a dostávajú sa z tela von močom.

2.5.2 Príjem vitamínu E

Vitamín E je pre organizmus veľmi dôležitý vďaka svojim funkciám. Jeho doporučená denná dávka je 8 mg pre ženy a 10 mg pre mužov. V prípade vitamínu E však nehrozí hypervitaminóza, pretože horná hranica prijatého množstva je až 800 mg denne. Jeho príjem by sme nemali zanedbávať, pretože priaznivo pôsobí proti kardiovaskulárnym chorobám, rakovine, chronickým zápalom, ale aj proti Alzheimerovej aj Parkinsonovej chorobe. Dôležité je však prijímať tento vitamín spolu s ďalšími antioxidantami ako je vitamín A, vitamín C alebo selén, ktoré potencujú jeho účinok a podporujú jeho obnovu.

Ako už bolo spomenuté, vďaka svojmu antioxidačnému pôsobeniu zabraňuje vzniku a rozvoju aterosklerózy a kardiovaskulárnych chorôb, pretože nedochádza k oxidácii LDL a proliferácii hladkej svaloviny ciev. V mnohých štúdiách bol tiež potvrdený jeho protirakovinový účinok. Bráni totiž oxidatívne poškodeniu DNA radikálmi, ktoré potencujú onkogenézu. V pečeni potkanov s nedostatkom vitamínu E bola zistená zvýšená miera poškodenia DNA. Dosiahnuté výsledky však nie sú úplne spoľahlivé, pretože nie je možné kontrolovať všetky faktory schopné navodiť vznik rakoviny a ovplyvňovať jej rozvoj.

3 CIEĽ PRÁCE

Táto práca bola zameraná na to, aby potvrdila alebo vyvrátila antioxidačný účinok vitamínu A, E a kyseliny retinovej a ich priaznivý vplyv na obnovu alveolárnej bazálnej membrány. Detailná štruktúra a zmeny bazálnej membrány boli pozorované prostredníctvom elektrónového mikroskopu. Tento experiment mal tiež zdôrazniť dôležitosť príjmu vitamínov, ktoré pôsobia ako antioxidanty, pretože výrazne znižujú oxidačný stres spôsobený vznikajúcimi voľnými radikálmi. Taktiež sa malo potvrdiť, že nedostatok vitamínu A v potrave spôsobuje reverzibilné zmeny bazálnej membrány pľúc a zníženie telesnej hmotnosti v dôsledku zníženého príjmu potravy. Čo sa týka zmien bazálnej membrány, hodnotila sa jej integrita, štruktúra, obsah kolagénových vlákien a hrúbka.

Hlavné ciele práce:

- prostredníctvom hladín markerov oxidačného stresu potvrdiť alebo vyvrátiť dôležitosť vitamínu A pre jeho výrazný antioxidačný účinok
- dokázať nepriaznivý vplyv deficitu vitamínu A na organizmus v súvislosti s príjmom potravy a so zmenami na bazálnej membráne pľúc
- pokúsiť sa o zmiernenie oxidačného stresu vzniknutého v dôsledku deficitu vitamínu A prostredníctvom podávania vyšších dávok vitamínu E a kyseliny retinovej
- potvrdiť alebo vyvrátiť priaznivý účinok vitamínu E a kyseliny retinovej na alveolárnu bazálnu membránu

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použité činidlá

Všetky činidlá, prípravky a tiež potrava použité v tomto experimente boli analytickej triedy čistoty. Boli získané z rôznych firiem a to hlavne *Boehringer Mannheim* (Nemecko), *Merk* (Darmstadt, Nemecko), *Bio-Rad* (California, USA), *Pancreac* (Španielsko) a *Sigma Chemicals* (Missouri, USA). Pentobarbital sodný použitý na usmrtenie zvierat bol získaný z laboratórií *Abott* a potrava podávaná zvieratám pochádzala z *ICN-Biomedical* (Ohio, USA).

4.2 Použité prístroje a nástroje

Počas tohto experimentu bolo použitých mnoho prístrojov a nástrojov ako pri odbere vzoriek a ich spracovávaní, tak aj pri ich pozorovaní:

- Odstredivky Microspin 24 od Sorvall Instruments, Sorvall model MC 12V, ďalej centrifúgy Eppendorf model 5415D, chladené centrifúgy Heraeus, modely Labofuge 200 a Labofuge 400R, na ktorých bola realizovaná centrifugácia pri malých rýchlostiach; pre vysokorýchlostnú centrifugáciu boli použité odstredivky Beckman Coulter OptimaTM Max a Heraeus Instruments Biofuge 13
- Ultrazvuk Branson model 1510
- Dvojlúčový spektrofotometer Shimadzu UV-160 a Hitachi U2000
- Ultramikrotomy LKB Bromma Ultratome III model 8800 a Ultracut Reichert Jung
- Transmisný elektrónový mikroskop Philips model CM-100
- HPLC systém zložený z dvoch čerpadiel Waters model 515, manuálneho vstrekovača Waters model 2157 a fotodiódového detektoru Waters 996 model 441
- Kolóny Nova-Pak C18 od firmy Waters pre detekciu tokoferolov, retinolu a malondialdehydu (MDA) s priemerom 3,9 mm a dĺžkou 150 mm a model Spherisorb s rozmermi 200 x 4,6 mm a s priemerom častíc 5 µm pre stanovenie oxidovaného glutatiónu GSSG

- Počítačový program Millenium Chromatography Manager pre spracovanie dát
- Vákuové čerpadlo Millipore pre filtráciu rozpúšťadiel, ktoré sú súčasťou mobilnej fázy HPLC
- Filtre značky Millipore s priemerom pórov 0,45 μm typu Durapore, ktorý je hydrofilný, používaný pre vodné rozpúšťadlá a vyrobený z polyvinylidén fluoridu (PVDF) a typu Fluoropore pre organické rozpúšťadlá a vyrobený z polytetrafluoretylénu (PTFE)
- Homogenizátor Potter-Elvehjem
- Ďalšie pomôcky a prístroje ako pH-meter Crison, meďou a niklom potiahnuté mriežky, teflónové piesty rôznych rozmerov, Hamilton striekačky rôznych kapacít, jednorázový plastový materiál, sklený laboratórny materiál, mraziace zariadenia s teplotou -20°C a -80°C a pod.

4.3 Laboratórne zvieratá

Pre tento experiment boli použité laboratórne potkany rasy Wistar. Počas celého experimentu sa s nimi zaobchádzalo v súlade s kritériami uvedenými v príručke pre použitie a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, ktorú vydala Národná akadémia vied (National Academy of Sciences) a publikoval Národný inštitút zdravia (National Institute of Health). Počas pokusov boli potkany rozdelené najprv do 3 skupín po dobu 60 dní:

- Kontrolné zvieratá, ktorým bola podávaná potrava s normálnym zložením vitamínov a minerálov (skupina C = Control)
- Zvieratá s nedostatkom vitamínu A, ktoré boli kŕmené potravou neobsahujúcou tento vitamín (skupina VAD = Vitamin A-Deficient)
- Zvieratá s nedostatkom vitamínu A, ktoré boli tiež kŕmené potravou bez obsahu vitamínu A, ale ich potrava bola obohatená o vitamín E (skupina VAD+E = Vitamin A-Deficient + Vitamin E)

Po 60-tich dňoch života boli potkany kontrolnej skupiny usmrtené a zvyšné dve skupiny boli rozdelené na 2 poskupiny. Polovica potkanov zo skupín VAD a VAD+E bola tiež usmrtená a zvyšným potkanom sa intraperitoneálne podávali olejové injekcie

s kyselinou retinovou po dobu 10 dní. Vznikli tak skupiny označené VAD+RA a VAD+E+RA. Presné zloženie podávanej potravy je v tabuľke č. 1.

4.4 Laboratórna potrava

Zloženie potravy podávanej laboratórnym zvieratám je veľmi dôležitou súčasťou experimentu. Vďaka potrave boli totiž dosiahnuté požadované podmienky a hodnoty vitamínov v telách potkanov. Existujú tri typy potravy, ktoré sa líšia čistotou ingrediencií. Prvý typ je nečistená potrava zložená z prírodných zdrojov. Ďalším typom je čistená potrava, ktorá pochádza z rafinovaných ingrediencií ako je napríklad kaseín alebo iné izolované proteíny. Posledný typ je chemicky definovaná potrava zložená len z chemicky čistých ingrediencií, napríklad izolovaných aminokyselín. Najviac sa v praxi používa posledný spomínaný typ potravy, pretože znalosť presného zloženia aj čistoty je v experimentoch veľmi dôležitá.

Počas experimentu boli zvieratá kŕmené potravou obsahujúcou zmes vitamínov a minerálov AIN-93G, ktorá vznikla po revízii a aktualizácii zmesi nazývanej AIN-76A. Táto zmes vitamínov a minerálov splňuje nutričné požiadavky potravy pre hlodavce stanovené Národnou výskumnou radou (National Research Council, 1978). Esenciálne živiny sú v nej v rovnováhe a používa sa v krátkodobých aj dlhodobých experimentoch. Zmes AIN-93G bola upravená pre rast, graviditu a laktáciu hlodavcov. Počas experimentu bola táto potrava podávaná kontrolnej skupine zvierat a ostatným dvom skupinám bola podávaná tiež, ale neobsahovala vitamín A. Detailné zloženie podávanej potravy a zmesi vitamínov a minerálov AIN-93G je uvedené v tabuľkách č. 1, 2 a 3.

Tabuľka 1: Zloženie potravy podávanej experimentálnym zvieratám

SÚČASTI POTRAVY	MNOŽSTVO [g/kg potravy]
Kukuričný škrob	397,5
Kaseín (zbavený vitamínov)	200,0
Kukuričný dextrín	132,0
Sacharóza	100,0
Sójový olej	70,0
Celulóza	50,0
Zmes minerálov AIN-93G-MX*	35,0
Zmes vitamínov AIN-93G-VX**	10,0

Tabuľka 2: Detailné zloženie minerálnej zmesi AIN-93G-MX

ZLOŽKY ZMESI AIN-93G-MX	MNOŽSTVO [kg zmesi]
Bezvodý uhličitan vápenatý	357,00 g
Dihydrogénfosforečnan draselný	196,00 g
Monohydrát citrátu draselného	70,78 g
Chlorid sodný	74,00 g
Síran draselný	46,60 g
Oxid horečnatý	24,00 g
Citrát železitý	6,06 g
Uhličitan zinočnatý	1,65 g
Nonahydrát meta-silikátu sodného	1,45 g
Uhličitan manganatý	0,63 g
Uhličitan meďnatý	0,30 g
Dodekyhydrát síranu chromito-draselného	0,28 g
Kyselina boritá	81,50 mg
Fluorid sodný	63,50 mg
Uhličitan nikelnatý	31,80 mg
Chlorid lítový	17,40 mg
Bezvodý seleničnan sodný	10,25 mg
Iodičnan draselný	10,00 mg
Tetrahydrát paramolybdénanu amónneho	7,95 mg
Vanadičnan amónny	6,60 mg
Sacharóza v prášku	221,02 g

Tabuľka 3: Detailné zloženie vitamínovej zmesi AIN-93G-VX

ZLOŽKY ZMESI AIN-93G-VX	MNOŽSTVO [/kg zmesi]
Niacín B ₃	3,00 g
Pantotenát vápenatý	1,60 g
Hydrochlorid pyridoxínu	0,70 g
Hydrochlorid tiamínu	0,60 g
Riboflavín	0,60 g
Kyselina listová	0,20 g
Biotín	0,02 g
Vitamín B ₁₂	2,50 g
α-tokoferol (250 UI/g)	30,00 g
Retinyl-palmitát (250 000 UI/g)	1,60 g
Vitamín D ₃ (400 000 UI/g)	0,25 g
Menadión	0,08 g
Sacharóza v prášku	958,85 g

4.5 Podávanie potravy laboratórnym zvieratám

Pre tento experiment boli na začiatku použité ťarchavé samice potkanov pochádzajúce z firmy Charles River (Barcelona). Po pôrode prebiehal celý pokus na samčích potomkoch. Jednotlivé experimentálne skupiny zvierat boli umiestnené v samostatných klietkach v izolovanej miestnosti s teplotou 22-25°C, konštantnou vlhkosťou a pravidelným striedaním svetla a tmy po 12-tich hodinách a tiež mali zabezpečený rovnaký prístup k potrave a voľný prístup k vode. Potrava bola pripravovaná denne, aby sa tak zabezpečili v každej skupine ekvivalentné dávky.

Ťarchavé samice sa rozdelili do troch pokusných skupín: kontrolná skupina (C), skupina s nedostatkom vitamínu A (VAD) a skupina s nedostatkom vitamínu A, ale nadbytkom vitamínu E (VAD+E). Do pôrodu bola ich potrava rovnaká, ale v deň pôrodu začali dostávať rozdielnu potravu líšiacu sa obsahom vitamínu A a E, aby boli dosiahnuté požadované efekty ako deficit retinolu. Kontrolnej skupine sa podávala potrava AIN-93G v súlade s odporúčaniami danými AIN (American Institute of Nutrition). VAD skupina dostávala tiež túto potravu, ale bez obsahu vitamínu A a skupina VAD+E taktiež, ale ich potrava obsahovala až 10-násobné množstvo vitamínu E oproti kontrolnej skupine.

Kŕmením samíc zo skupiny VAD potravou bez vitamínu A sa dosiahli nižšie hladiny tohto vitamínu aj v materskom mlieku a skrátilo to tiež dobu potrebnú na vyvolanie deficitného stavu u mláďat. Produkciu mlieka ani normálny rast potomstva to však neovplyvnilo. Po 21 dňoch, čiže po období laktácie, boli mláďatá samčieho pohlavia taktiež kŕmené rovnakou potravou ako matky až do ich 60. dňa života, pretože dovtedy bol vyvolaný požadovaný deficit vitamínu A, ale nedochádzalo ešte k vážnemu poškodeniu rastu zvierat. V prípade, že by im bola podávaná táto potrava ešte dlhšie, by mohlo dôjsť k zníženému príjmu potravy, negatívnemu ovplyvneniu rastu a k predčasnej smrti.

Po 60-tich dňoch boli všetky zvieratá kontrolnej skupiny C usmrtené rovnako ako polovica skupiny VAD a polovica skupiny VAD+E. Zo zvyšnými polovicami týchto dvoch skupín sa následne zaobchádzalo rovnakým spôsobom. Po dobu 10 dní im boli podávané intraperitoneálne olejové injekcie kyseliny *all-trans*-retinovej v koncentrácii 100 µg/100 µl slnečnicového oleja.

4.6 Získavanie biologických vzoriek

Zvieratá boli uspaté a usmrtené peritoneálnou injekciou pentobarbitalu sodného v množstve 50 mg na 1 kg váhy. Na získanie vzoriek krvi boli použité heparinizované striekačky a vpich bol vedený do abdominálnej aorty. Následne sa vybrali pľúca, ktoré sa po premytí fyziologickým roztokom odvážili a boli zmrazené tlakom medzi dvoma hliníkovými fóliami. Tieto fólie boli vopred schladené tekutým dusíkom a jedná sa o tzv. zmrazovaciu upínaciu techniku (freeze-clamping technique), v ktorej je tenká vrstva tkaniva zmrazená veľmi rýchlo. Takto spracované pľúca boli uskladnené pri teplote -80°C až do ich použitia.

Vzorky určené pre elektrónovú mikroskopiu boli spracované iným spôsobom. Zvieratám bola po ich uspatí zavedená infúzia do karotídy, ktorá obsahovala fixačný 4% roztok formaldehydu a 0,5% roztok glutaraldehydu v kakodylátovom pufri s koncentráciou 0,1 M a pH 7,4. Táto infúzia s fixátorom zabezpečila lepšiu ochranu a zachovanie tkanív. Jej rýchlosť bola po dobu dvoch minút 25ml/min a potom sa znížila na 4ml/min po dobu 13-tich minút. Po tejto 15-minútovej infúzii sa pľúca vyňali,

nakrájali na 1-2 mm široké časti, pričom jedna polovica z nich bola použitá na štúdium ultraštruktúry a druhá polovica na imunocytochemickú analýzu.

4.7 Extrakcia retinoidov, α -tokoferolu a ich stanovenie

Procesy prípravy vzoriek pre analýzu a stanovenie obsahu retinoidov a α -tokoferolu v plazme, pľúcach a pečeni boli rovnaké. Pri ich získaní sa využili metódy extrakcie do hexánovej fázy, ktoré sa využívajú aj v prípade iných v tukoch rozpustných vitamínov. V plazme sa stanovovalo množstvo retinolu, pretože je to najčastejšia transportná forma a v pľúcach sa zas vyskytuje najmä ako retinyl-palmitát. Vzorky krvi pre stanovenie plazmatických hodnôt boli po celý čas chránené pred svetlom a spracované nasledujúcim spôsobom. Najprv sa odstredili pri rýchlosti 2000g po dobu 10-tich minút pre oddelenie plazmy. Následne sa ku 100 μ l plazmy pridalo 100 μ l čistého etanolu a 250 μ l hexánu. Táto zmes sa trepala 2 minúty a potom sa odstredovala 5 minút pri rýchlosti 700g. Zo vzniknutej hexánovej fázy sa odobralo 200 μ l do skúmavky, v ktorej sa odparila do sucha prostredníctvom atmosféry dusíka. Zvyšok po odparení sa rozpustil v 100 μ l zmesi metanol : etanol v pomere 1 : 1 (v:v) a celé sa premiešalo po dobu 2 minút. Následne boli množstvá stanovené chromatograficky metódou HPLC, pričom do chromatografickej kolóny sa vstrekovalo vždy 20 μ l poslednej vzniknutej zmesi.

Pre stanovenie retinoidov v pľúcach bolo použitých 50 g pľúc z každej skupiny experimentu. Pľúca s pridanými 2 ml fyziologického roztoku s fosfátovým pufrom (PBS; Phosphated Buffered Saline) sa zhomogenizovali pomocou homogenizátoru za studena a jednu minútu boli vystavené atmosfére dusíka, ktorá obsahovala 50 μ l roztoku butylhydroxytoluénu (BHT) s koncentráciou 1mg/ml. Vzniknuté homogenáty sa umiestnili do skúmaviek a pridal sa 1 ml roztoku SDS (dodecyl sulfát sodný) s koncentráciou 0,1 mM. Táto zmes sa trepala 30 sekúnd, následne podstúpila ultrazvuk po dobu 15-tich sekúnd, ďalších 15 sekúnd sa chladila ľadom a nakoniec sa znova trepala 15 sekúnd. Pridali sa 2 ml etanolu a zmes sa za studena vystavila inertnej atmosfére dusíka. Potom sa primiešali 2 ml hexánu a po dvojminútovom trepaní sa celá zmes odstredovala 5 minút rýchlosťou 1000g pri teplote 4°C. Zo vzniknutej hexánovej fázy sa odobralo 1,75 ml a odparilo sa dusíkovou atmosférou do sucha. Vzniknuté zvyšky boli rozpustené v 150 μ l zmesi acetonitril : dichlórmetán : metanol v pomere

70 : 20 : 10 (v:v:v). Všetko sa 30 sekúnd trepalo a 15 sekúnd ultrazvukovalo. Táto konečná zmes bola použitá pre kvantitatívne stanovenie obsahu pomocou HPLC, pričom do chromatografickej kolóny sa vstrekovalo vždy 40 µl roztoku.

Počas chromatografického stanovenia boli hadičky chromatografu chránené pred svetlom a udržiavané pri teplote 4°C. Pre zistenie hodnôt absorbančie bol použitý fotodiódový detektor (PhotoDiode Array, PDA) s rozmedzím vlnových dĺžok 200-550 nm. α-tokoferol bol stanovený pri vlnovej dĺžke 292 nm a retinoidy pri vlnovej dĺžke 325 nm. Vzorky boli detegované na chromatografickej kolóne s reverznou fázou NovaPak C-18 od firmy Waters, s priemerom 3,9 mm a dĺžkou 150 mm. Mobilná fáza bola tvorená zmesou acetonitril : dichlórmetán : metanol v pomere 70 : 20 : 10 (v:v:v). Mobilná fáza sa aplikovala 15 minút prietokovou rýchlosťou 1ml za minútu. Pri týchto podmienkach bol dosiahnutý retenčný čas retinolu 2 minúty, retinyl-palmitátu 8 minút a α-tokoferolu 3 minúty.

4.8 Stanovenie hladín malóndialdehydu

Malóndialdehyd (MDA) predstavuje hlavný produkt peroxidácie lipidov spolu s ďalšími látkami ako iné aldehydy, uhl'ovodíkové plyny, alkány či izoprostány a tým jeho množstvo odzrkadľuje mieru poškodenia oxidačným stresom, ktorý bol vyvolaný voľnými radikálmi. Pre jeho chromatografické stanovenie bola použitá metóda založená na kyslej hydrolýze lipoperoxidov, ktoré sú prítomné v plazme alebo mitochondriách, prostredníctvom kyseliny ortofoforečnej pri teplote 100°C. Touto hydrolýzou vzniká práve spomínaný malóndialdehyd, ktorý reakciou s kyselinou tiobarbiturovou (TBA) vytvára kvantifikovateľný produkt, komplex [MDA-TBA₂]. Tento produkt bol stanovovaný pri vlnovej dĺžke 532 nm.

Z každej skupiny experimentálnych zvierat sa odobralo 0,1 g pľúcnych fragmentov a pridal sa 1 ml pufru Tris-HCl s koncentráciou 50 mM a pH 7,5, ktorý obsahoval 0,1% roztok Triton X-100. Pridalo sa ešte 5 µl zmesi inhibítorov proteáz (Sigma – P8340) a vytvoril sa homogenát. Ten sa dvakrát po sebe vystavil ultrazvuku za studena po dobu 30 sekúnd a následne bol odstredený pri 450000g po dobu 10-tich minút. Celý proces prebiehal pri teplote 4°C a vzniknuté supernatanty boli zmrazené na teplotu -20°C až do doby ich použitia pre stanovenie hladín MDA.

Taktiež bola pripravená reakčná zmes pre kyslú hydrolýzu a tvorbu kvantifikovateľných produktov. Túto zmes tvorilo 750 μ l kyseliny ortofosforečnej s koncentráciou 0,44 M, 250 μ l tiobarbiturovej kyseliny (TBA) s koncentráciou 6 mg/ml, 450 μ l vody a 50 μ l homogenátu pľúc. Táto reakčná zmes sa po dobu 1 hodiny zahrieva pri teplote 100°C a následne sa nechala schladnúť v ľade. Potom bola zneutralizovaná roztokom zloženým zo 4,5 ml metanolu a 0,5 ml hydroxidu sodného 3M a celý tento roztok sa premiešal a odstredoval 5 minút pri 15000g a pri teplote 4°C. Výsledný produkt [MDA-TBA2] je však v neutrálnom prostredí nestabilný a preto sa musel do chromatografu vstrekovať hneď po neutralizácii, max. do 10-tich minút. Vstrekané množstvo bolo 50 μ l a tento produkt bol stanovovaný pri vlnovej dĺžke 532 nm prostredníctvom fotodiódy (PDA) s rozsahom dĺžok 200-550 nm. Mobilnú fázu tvorila zmes acetonitrilu a 50mM roztoku $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ s pH 6,8 v pomere 15 : 85 (v:v). Pre stanovenie bola použitá chromatografická kolóna NovaPak C-18 od firmy Waters s reverznou fázou, s rozmermi 3,9 mm v priemere a 150 mm na dĺžku. V týchto podmienkach dosiahol malóndialdehyd retenčný čas 3 minúty.

4.9 Stanovenie hladín glutatiónu

Glutatión predstavuje tiež dôležitú látku s antioxidačným pôsobením v organizme a jeho hladiny môžu vystupovať ako ukazovatele oxidačného stresu. Keď je organizmus vystavený zvýšenému pôsobeniu voľných radikálov, dochádza k zníženiu hladín redukovaného glutatiónu GSH, pretože sa vyčerpáva antioxidačnými reakciami a oxiduje sa na glutatión disulfid GSSG. Pre stanovenie jeho hladín sa použila metóda, v ktorej sa glutatión konjuguje s 1-chlór-2,4-dinitrobenzénom (CDNB), pričom je reakcia katalyzovaná *glutatión-S-transferasou* (GST). Výsledným produktom je teda konjugát GS-DNB a molekuly chlóru, pričom produkt GS-DNB absorbuje svetlo pri vlnovej dĺžke 340 nm a jeho hodnoty boli zistené spektrofotometricky.

V tomto experimente boli stanovené hladiny GSH v pľúcach potkanov. Vytvoril sa homogenát z 0,25 g tkaniva, 1 ml 6% kyseliny perchlórovej (PCA) a 1mM EDTA. Počas homogenizácie sa vzorky chladili ľadom. Potom boli odstredované 15 minút rýchlosťou 15000g pri teplote 4°C. Vzniknuté supernatanty sa použili pre analýzu, ale do doby potreby boli uchovávané v ľade.

Pre analýzu sa vytvorila reakčná zmes, ktorú tvorilo 750 μ l pufru fosfátu draselného (0,1 M), EDTA (1 mM), 10 μ l CDNB (10 mM) rozpusteného v etanole a 10-100 μ l vzorky. Pri vlnovej dĺžke 340 nm sa spektrofotometricky namerala absorbancia E_1 . Následne bol pridaný katalyzátor *glutatión-S-transferasa* v množstve 5 μ l a s koncentráciou 12 UI/ml a merala sa absorbancia E_2 až do ukončenia reakcie. Vzniknutý rozdiel $E_2 - E_1$ je priamo úmerný množstvu GSH prítomného vo vzorkách.

Použitý enzým GST však musel byť pred analýzou a spektrofotometriou dialyzovaný. Na to bola použitá dialyzačná membrána Sigma vo forme vaku s priemerom 16 mm a dĺžkou 300 mm. Vo vnútri dialyzačného vaku sa nachádzal 0,1M fosfátový pufer a 1mM EDTA s pH 7 a na kažých 0,8 ml tohto roztoku sa pridalo 5 mg dialyzovaného enzýmu. Celá membrána bola umiestnená v nádobe obsahujúcej taktiež rovnaký pufer a dialýza prebiehala za magnetického miešania a zníženej teploty. Trikrát po sebe sa v dvojhodinových intervaloch menil pufer a týmto spôsobom bol na záver získaný dialyzovaný enzým, ktorý sa do doby potreby uchovával pri teplote -20°C .

4.10 Stanovenie hladín oxidovaného glutatiónu

Oxidovaný glutatión (GSSG) predstavuje tiež dôležitý marker oxidačného stresu. Jeho zvýšené hladiny poukazujú na zvýšený oxidačný stres rovnako ako znížený pomer GSH/GSSG. Pre stanovenie jeho hladín bola použitá metóda, ktorú v roku 1980 popísal Reed, ale neskôr v roku 1987 ju modifikovali Farris a Reed. Spočíva v tom, že najprv sa musia ochrániť voľné tiolové skupiny glutatiónu GSH, aby sa zabránilo autooxidácii, čo by viedlo k vyšším hladinám nameraného oxidovaného glutatiónu GSSG. Na ochranu tiolových skupín sa použil N-etylmaleimid (NEM), pretože oproti pôvodne používanej jodooctovej kyseline reaguje s tiolovými skupinami rýchlejšie. V druhej fáze už vznikajú detegované deriváty 2,4-dinitrofenylové, ktoré sú stanovené HPLC metódou na reverznej fáze.

Na prípravu homogenátu sa použilo 0,25 g príslušného tkaniva, pridali sa 1 ml 6% perchlórovej kyseliny (PCA), 1mM batofenantrolín disulfonová kyselina ako chelátor kovov a N-etylmaleimid s koncentráciou 20 mM. Proces homogenizácie prebiehal za zníženej teploty. Následne boli vzorky 4 minúty odstredované pri teplote 4°C . Vzniknuté supernatanty boli až do času potreby uskladnené pri teplote -20°C .

Na derivatizáciu sa odobralo 300 μ l supernatantu, pridalo sa 30 μ l meta-kresolu s koncentráciou 0,2 mM. Potom sa vzorky zneutralizovali 3M roztokom hydroxidu draselného a 0,3M kyselinou 2-[N-cyklohexylamino]etánsulfónovou (CHES). Vzorky boli opäť odstredené pri rýchlosti 15000g po dobu 15-tich minút a pri teplote 4°C. Následne sa 300 μ l 1-fluoro-2,4-dinitrobenzénu (FDNB), ktorý bol rozpustený v 1% etanole, zmiešalo so 150 μ l vzniknutého supernatantu. Takto upravené vzorky sa inkubovali a sušili v tme po dobu 45 minút za zníženého tlaku (700 mtorr). Potom boli zmrazené na teplotu -20°C až do doby ich použitia. V čase potreby pre chromatografickú analýzu sa vzorka rozpustila v 160 μ l mobilnej fázy A, ktorá bola zložená z metanolu a vody v pomere 80 : 20 (v:v). Vzorka sa 5 minút odstredovala rýchlosťou 1000g a pre chromatografiu bolo použitých 45 μ l vzniknutého supernatantu.

Stacionárnu fázu chromatografickej analýzy tvorila kolóna Spherisorb s rozmermi 4,6 mm v priemere a dlhá 200 mm s veľkosťami častíc 5 μ m. Pri HPLC stanovení sa zloženie mobilnej fázy časom menilo. Mobilná fáza bola totiž zložená z fázy A a fázy B, pričom prvá z nich bola tvorená 80% roztokom metanolu a fáza B 0,5M roztokom octanu sodného v 64% metanole. Prvých 5 minút bol pomer fází A : B 80 : 20 (v:v). Nasledujúcich 10 minút sa tento pomer menil lineárne až do pomeru 1 : 99 (v:v). Výsledný pomer, v ktorom dochádza k eluácii oxidovaného glutatiónu, sa udržiaval po dobu 35-tich minút a na záver na posledných 10 minút sa obnovil pôvodný pomer fází A a B. Počas celej analýzy bol tok mobilnej fázy konštantný a rýchlosť bola 1 ml/min. Detekcia zlúčenín bola pri vlnovej dĺžke 365 nm a boli získané tieto výsledky: produkt GSH-NEM sa štiepil na 3 píky eluované za 12, 15 a 16 minút. V 19. minúte sa nachádzal menší pík, ktorý odpovedá oxidovanému glutatiónu GSSG.

4.11 Spracovávanie vzoriek pre elektrónovú mikroskopiu

Vzorky určené na morfológickú analýzu – boli spracované iným postupom ako vzorky pre imunocytochemickú analýzu. Týmto spôsobom boli spracované fragmenty pľúc potkanov z každej skupiny, čiže zo skupiny kontrolnej a zo skupín VAD, VAD+E, VAD+RA a VAD+E+RA. Tieto fragmenty sa dali do nádobiek, v ktorých sa následne fixovali a farbili. Po týchto procesoch sa dehydratovali, zalievali do špeciálnych živíc, enkapsulovali a polymerizovali.

Fixácia a farbenie prebiehali tak, že sa najprv ku vzorkám pridali roztoky 1% formaldehydu a 1,5% glutaraldehydu v kakodylátovom pufri s koncentráciou 0,5 M a pH 7,4 a výsledná zmes sa inkubovala po dobu 60 minút pri teplote 4°C. Po inkubácii boli vzorky 10 minút premývané 0,1M kakodylátovým pufrom s pH 7,4 tiež pri teplote 4°C. Tento proces sa vykonal dokopy trikrát. Následne boli vzorky vystavené 1% roztoku oxidu osmičelého a 1% roztoku hexakynoželezitanu draselného po dobu 60-tich minút, pri teplote 4°C a v tmavom prostredí. Potom sa vzorky 5 minút premývali v destilovanej vode tiež pri zníženej teplote 4°C, pričom premytie sa realizovalo trikrát. Keď boli vzorky premyté, nasledovala ich fixácia pomocou 0,15% roztoku tanínu (acidum tannicum) v 0,1M kakodylátovom pufri s pH 7,4 po dobu 1 minúty, no tentokrát pri izbovej teplote. Po 1 minúte sa vzorky premyli rovnakým pufrom a následne dvakrát po sebe destilovanou vodou, vždy po dobu 5 minút. Potom boli vzorky v kontakte s 2% roztokom uranyl acetátu vo vode po dobu 120 minút, za tmy a pri izbovej teplote. Nakoniec sa 3-krát po dobu 5-tich minút premyli destilovanou vodou tiež pri izbovej teplote.

Dehydratácia vzoriek sa realizovala prostredníctvom roztokov etanolu s rôznymi koncentraciami. Najprv bol použitý etanol s koncentráciou 50 %, potom 75 %, 90 % a nakoniec trikrát po sebe 100% etanol, pričom každý roztok pôsobil na vzorky 5 minút pri teplote 4°C.

Keď boli vzorky dehydratované, mohla sa vykonať ich infiltrácia do špeciálneho fixačného média nazývaného Epon 812. Jedná sa o epoxyalifatickú živicu, ktorá je hydrofóbná a využíva sa pre štúdium ultraštruktúry tkanív. Vzorky, ale aj použité nádoby museli byť vysušené, pretože prítomnosť vlhkosti zhoršuje neskoršiu polymerizáciu. Fixačné médium sa skladalo zo štyroch častí: Epon 812 (špeciálna živica), DDSA (DoDecenyl Succinyl Anhydride), NMA (Nadic Methyl Anhydride; s funkciou tužidla, slúži na spevnenie) a 3% BDMA (BenzylDiMethylAmine; slúžiaci ako akcelerátor). Najprv sa nádobky so živicom a tužidlom umiestnili do sušiarne spolu so skúmavkou a Erlenmayerovou bankou na 10 minút. Potom sa nalialo 20 ml epoxidovej živice, 16 ml DDSA a 8 ml NMA do Erlenmayerovej banky. V nej sa všetko pomaly miešalo tak, aby nedochádzalo ku vzniku vzduchových bublín. Miešalo sa niekoľko minút až do vyjasnenia zmesi. Nakoniec sa pridalo 1,3 ml urýchľovača BDMA a miešalo sa ďalšie 1-2 minúty. Potom nasledovala infiltrácia vzoriek, ktorá prebiehala tak, že sa vzorky umiestnili na dobu 60-tich minút do zmesi Epon-u a etanolu

v pomere objemov Epon : etanol 1 : 2 (v:v). Potom sa pomer objemov Epon : etanol zmenil na 1 : 1 (v:v) a nechalo sa pôsobiť ďalšiu hodinu. Nakoniec sa zmenil tento pomer na 2 : 1 (v:v) a takto sa nechalo stáť tiež hodinu, pričom všetky tri kroky infiltrácie prebiehali pri izbovej teplote. Úplne posledným krokom bola infiltrácia pri 4°C počas celej noci, pričom médium bolo tvorené samotným Epon-om.

Na záver sa vykonala enkapsulácia, čiže zapuzdrenie vzorky tkaniva. Tá sa umiestnila na dno želatínovej kapsuly, ktorá sa až po vrch zaliala čerstvou pripravenou živcovou zmesou. Takto spracované kapsule boli umiestnené v sušiarňi pri 60°C po dobu 48-mich hodín. Po úspešnej enkapsulácii a polymerizácii sa vzorky uskladňovali pri izbovej teplote až do doby použitia.

Vzorky určené na imunocytochemickú analýzu – boli spracované inak ako vyššie spomenuté. Základný postup je však podobný. Najprv sa vzorky fixovali, dehydratovali, infiltrovali a nakoniec tiež enkapsulovali a polymerizovali.

Fixácia vzoriek sa vykonala prostredníctvom fixačného roztoku, ktorý sa skladal zo 4% roztoku formaldehydu, 0,5% roztoku glutaraldehydu a 0,1M kakodylátového pufru s pH 7,4 a proces prebiehal 120 minút pri izbovej teplote. Po ukončení pôsobenia roztoku sa vzorky trikrát po 15 minút premyli samotným 0,1M kakodylátovým pufrom s pH 7,4 tiež pri izbovej teplote. Potom prebehla inkubácia vzoriek v 50mM roztoku chloridu amónneho v 0,1M kakodylátovom pufri s pH 7,4 pri teplote 0°C po dobu 50-tich minút a počas tejto inkubácie malo dôjsť k zablokovaniu aldehydických skupín. Na záver sa vzorky premyli znova spomínaným kakodylátovým pufrom, pričom sa vykonali tri 10-minútové premývania pri teplote 0°C.

Ďalším krokom bola dehydratácia a dehydratačné médium tvoril metanol. Najprv sa vzorky vystavili 5 minút metanolu s koncentráciou 30 %, potom ďalších 5 minút metanolu s koncentráciou 50 %, pričom oba kroky prebiehali pri teplote 4°C. Následne sa dehydratovalo 5 minút 70% metanolom pri teplote -10°C a nakoniec 30 minút 90% metanolom pri teplote -20°C.

Ďalej nasledovala infiltrácia vzoriek, pričom infiltračné médium bola akrylová živica nazývaná Lowicryl K4M, ktorá je na rozdiel od Epon-u hydrofilná. Je zložená z troch súčastí v presnom pomere. Sú to tzv. cross-linker (4 g), monomér (26 g)

a iniciátor (0,15 g). Tieto zložky sa opatrne zmiešali, aby sa zamedzilo vzniku vzduchových bublín. Pri tomto procese dochádzalo ku vývoju toxických pár Lowicrylu, preto sa celý proces musel realizovať v digestore za použitia ochranných pomôcok. Infiltrácia prebiehala najprv 60 minút v zmesi metanol : Lowicryl v pomere 1 : 1 (v:v), potom ďalších 60 minút v zmesi metanol : Lowicryl v pomere 1 : 2 (v:v) a na záver celú noc v samotnom Lowicryle. Všetky kroky prebiehali pri teplote -20°C .

Pre enkapsuláciu boli taktiež použité želatínové kapsule, do ktorých boli vzorky zapuzdrené. Umiestnili sa na ich dno a zaliali sa čerstvo pripravenou živicom Lowicryl K4M a tieto kapsule sa premiestnili do nádoby chránenej hliníkovou fóliou pred svetlom. Následná polymerizácia prebiehala pôsobením UV svetla s vlnovou dĺžkou 366 nm. Vzorky boli pod UV lampou Philips TL6/05 umiestnené vo vzdialenosti 30 cm po dobu 7-mich dní a v teplote -20°C . Následne boli polymerizované ďalších 7 dní pri izbovej teplote za rovnakých podmienok. Pri izbovej teplote boli tiež uchovávané až do momentu potreby.

4.12 Získavanie a farbenie rezov a štúdium ultraštruktúry

Pre štúdium ultraštruktúry bolo potrebné získať ultratenké rezy zo zapuzdrených vzoriek tkanív. Najprv sa však pre lokalizáciu vhodnej časti tkaniva získali tzv. semitenké rezy s hrúbkou $1\text{ }\mu\text{m}$. Tieto rezy sa z Eponových aj Lowicrylových kapsúl získali pomocou ultramikrotomu LKB Bromma Ultratome III model 8800, ktorého čepele sú vyrobené zo skla. Vzniknuté rezy boli ofarbené toluénovou modrou, aby bolo možné ich pozorovanie svetelným mikroskopom Olympus. Keď sa vďaka $1\text{ }\mu\text{m}$ rezom lokalizovala oblasť, v ktorej sa nachádza správne a dostatočné množstvo štruktúr vhodných pre štúdium ich ultraštruktúry, mohlo sa prejsť k získavaniu ultratenkých rezov.

Najprv sa manuálne za použitia skalpelovej čepele ohraničila táto oblasť záujmu a orezala sa do pyramídového tvaru, pričom plocha zrezaného vrcholku obsahujúceho vzorku mala plochu cca 1 cm^2 . Takto orezané kapsule sa umiestnili do ultramikrotomu Ultracut Reichert Jung a rezy boli vedené tak, že rezné plochy boli rovnobežné s okrajom čepele a hrúbka rezov bola nastavená na 90 nm. Takto získané rezy boli umiestnené na špeciálne mriežky potiahnuté meďou alebo niklom. Pre rezy

z Eponových kapsúl sa používajú mriežky obalené meďou a pre Lowicrylové sú mriežky obalené niklom.

Tieto ultratenké rezy sa následne museli ofarbiť, aby bolo možné ich pozorovanie. Pre farbenie bol použitý uranyl-acetát a citrát olovnatý. Najprv bol pripravený 2% roztok uranyl-acetátu vo vode, bol sfiltrovaný a uskladnený pri 4°C a chránený pred svetlom až do doby použitia. Pred použitím bol sfiltrovaný ešte jedenkrát filtrom Millipore 0,22 µm.

Druhý použitý farbiaci roztok citrátu olovnatého bol pripravený tak, že sa rozpustilo 3,52 g citrátu sodného v 60 ml destilovanej vody a pridalo sa 2,66 g dusičnanu olovnatého. Táto suspenzia sa 1 minútu miešala a nechala sa stáť, pričom každých 5 minút sa premiešala znova. To sa opakovalo až do vyčerpania dusičnanu olovnatého, čo sa prejavilo vznikom mliečne zafarbeného roztoku. Na záver sa pridalo 16 ml 1M hydroxidu sodného a až do úplného vyjasnenia roztoku sa pomaly miešalo a doplnilo destilovanou vodou na 100 ml.

Samotné farbenie prebiehalo tak, že sa na tzv. parafilme vytvorili kvapky z uranyl-acetátu s objemom cca 20 µl a na ich povrch boli umiestnené mriežky s rezmí tkaniva a ich vzájomný kontakt pretrvával po dobu 20-tich minút. Potom sa dvakrát premyli destilovanou vodou a nechali sa vysušiť na vzduchu. Po vysušení sa opäť vytvorili kvapky, no tentokrát kvapky citrátu olovnatého a vzorky boli na nich umiestnené po dobu 1 minúty. Následne boli ihneď premyté prúdom destilovanej vody a vysušené na vzduchu. Táto druhá kontrastácia však prebiehala v prítomnosti hydroxidu sodného, ktorý eliminuje oxid uhličitý. V prítomnosti oxidu uhličitého by totiž dochádzalo ku vzniku uhličitanu olovnatého, ktorý by nepriaznivo ovplyvňoval finálnu vizualizáciu vzoriek.

Pre štúdium ultraštruktúry boli náhodne vybrané vzorky spomedzi dostupných vzoriek pre každú skupinu experimentu, čiže zo skupín VAD, VAD+E, VAD+RA, VAD+E+RA a kontrolnej skupiny. Na týchto vzorkách, ktoré pochádzali z rôznych častí pľúc, sa sledovala bazálna membrána, jej hrúbka a zmeny jej štruktúry či kompozície vyvolané nedostatkom vitamínu A a doplnením vitamínom E. Rozdiely v bazálnych membránach jednotlivých skupín zvierat boli pozorované transmisným elektrónovým mikroskopom Philips CM-100 pri 13500-násobnom zväčšení. Pre každú skupinu bolo vyhotovených minimálne 30 mikroskopických snímok a hrúbka bazálnej

membrány sa merala v jej rôznych oblastiach. Vypočítala sa priemerná hodnota a smerodatná odchylka pre rôzne skupiny zvierat a hodnoty boli porovnané v tzv. teste ANOVA (Analysis Of Variance).

Štatistické spracovanie výsledkov bolo teda realizované prostredníctvom jednosmernej analýzy rozptylu, tzv. testu ANOVA v 1 kroku. Použité softvéry pre grafické a štatistické spracovanie dát boli: Microsoft Excel (Microsoft Corporation), Prism 5 for Macintosh (GraphPad Software, Inc. 2005), Pages '08 (Copyright Apple Inc.). Pre spracovanie obrázkov boli použité: ImageJ 1,38g (National Institute of Health, USA) a Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated, 2007).

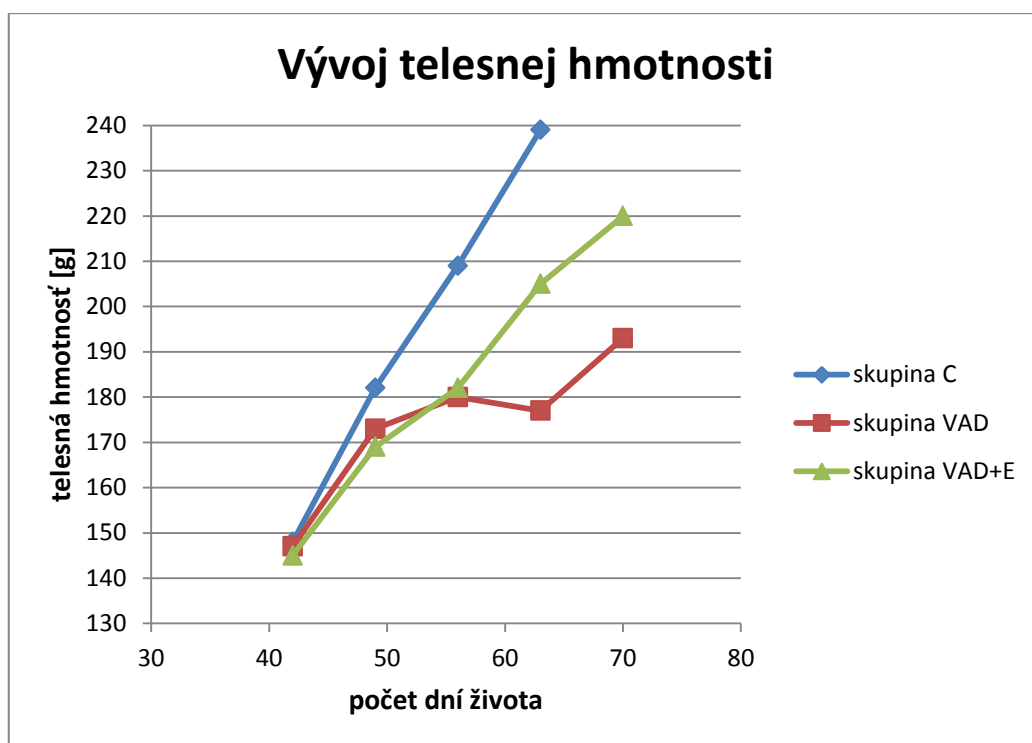
5 VÝSLEDKY

5.1 Štúdium telesnej hmotnosti

Počas tohto experimentu sa taktiež pozorovali zmeny telesnej hmotnosti skupín potkanov. Tieto zmeny sa začali zaznamenávať až po 35. dni ich života, pretože do tohto okamihu bola ich telesná hmotnosť približne rovnaká. Od 35. dňa sa merala ich telesná váha každý týždeň. Vznikli teda hodnoty namerané v 42. dni, 49. dni, 56. dni, 63. (pre kontrolnú skupinu v 60. dni, pretože tá bola usmrtená) a v 70. dni. Boli získané hodnoty pre kontrolnú skupinu, skupinu VAD a VAD+E, pričom VAD skupina sa po 60 dňoch zmenila na VAD+RA skupinu a rovnako aj VAD+E po 60. dni pokračovala ako VAD+E+RA skupina.

Na nasledujúcom grafe môžeme vidieť, že najvýznamnejšia zmena bola približne v 60. dni ich života. U potkanov skupiny VAD sa prejavoval deficit vitamínu A ich zníženou hmotnosťou oproti kontrolnej skupine a pokles príjmu potravy sa teda odrazil aj na poklese ich telesnej hmotnosti. Tiež sa zmenila kvalita ich kože, ktorá bola sfarbená nepravidelne, bola šedastej farby a na chvoste mali potkany tejto skupiny početné tmavé škvrny. Tieto zvieratá boli zjavne oslabené a v prípade dlhšie pretrvávajúceho deficitu by pravdepodobne predčasne zahynuli. Po uplynutí 60-tich dní sa im však začali podávať injekcie s kyselinou retinovou až do 70. dňa života a ako vidno na grafe, ich telesná hmotnosť sa výrazne upravila a zlepšil sa ich stav.

U potkanov skupiny VAD+E bola síce telesná hmotnosť znížená oproti kontrolnej skupine, ale počas celej doby kontinuálne rástla a nedošlo k úbytku hmotnosti, aj keď boli hodnoty spočiatku približne rovnaké ako hodnoty skupiny VAD. Rovnaký priebeh bol aj u kontrolnej skupiny, ktorá mala vďaka prísunu kompletnej potravy najvyššiu telesnú hmotnosť a zvyšovala sa po celý čas výskumu. Po uplynutí 60-tich dní však boli potkany skupiny C usmrtené.



Obrázok 5: Vývoj telesnej hmotnosti v závislosti od podávanej potravy

Každý bod predstavuje aritmetický priemer telesných hmotností všetkých potkanov príslušnej skupiny, pričom v každej skupine sa nachádzalo 5 potkanov.

5.2 Stanovenie hladín retinolu, retinyl-palmitátu a α -tokoferolu v plazme a v pľúcach

Aby sme mohli pozorované zmeny membrány a jej prípadné poškodenia pripisovať deficitu vitamínu A, musela sa preukázať znížená hladina alebo úplné vyčerpanie tohto vitamínu v plazme. Stanovovali sa hladiny retinolu, ktorý predstavuje základnú transportnú formu vitamínu A a tiež hladiny retinyl-palmitátu, ktorý reprezentuje jeho zásobnú formu. Taktiež boli stanovené hladiny α -tokoferolu. Stanovenie hladín retinyl-palmitátu nám umožnili potvrdiť predpoklad, že deficit vitamínu A v plazme spôsobuje vyčerpanie pľúcnych zásob retinyl-palmitátu. Stanovenie hladín retinolu, retinyl-palmitátu aj α -tokoferolu bolo prostredníctvom metódy HPLC ako bolo popísané v stati 4.7. Konkrétne namerané hodnoty sú uvedené v tabuľke č.4.

Tabuľka 4: Koncentrácie retinolu, retinyl-palmitátu a α -tokoferolu v plazme a pľúcach potkanov všetkých experimentálnych skupín

PLAZMA [$\mu\text{mol/l}$]	Skupina CONTROL	Skupina VAD	Skupina VAD+E	Skupina VAD+RA	Skupina VAD+E+RA
<i>All-trans</i> retinol	1,20 \pm 0,29	0,05 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a
α -tokoferol	36,00 \pm 0,56	21,00 \pm 0,43 ^a	49,00 \pm 0,35 ^{ab}	26,00 \pm 0,80 ^{ab}	46,00 \pm 0,59 ^{ab}
PLŮCA [nmol/g]					
<i>All-trans</i> retinol	1,53 \pm 0,20	0,04 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a
retinyl- palmitát	2,33 \pm 0,39	0,005 \pm 0,004 ^a	0,004 \pm 0,003 ^a	0,04 \pm 0,02 ^a	0,05 \pm 0,02 ^a
α -tokoferol [mg/g pľúc]	14,30 \pm 0,54	9,00 \pm 0,45 ^a	17,30 \pm 0,74 ^{ab}	10,81 \pm 0,57 ^{ab}	15,80 \pm 0,43 ^{ab}

Hodnoty v tabuľke sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD (smerodratná odchylka). V každej skupine zvierat sa nachádzalo 5 potkanov. Indexom ^a sú označené výsledky, ktoré sa výrazne odlišujú od referenčnej skupiny CONTROL s hodnotou $P < 0,05$. Index ^b označuje výsledky výrazne odlišné od skupiny VAD a tiež majú hodnotu $P < 0,05$.

Ako je možné vidieť v tabuľke, nedostatok vitamínu A v potrave spôsobil značný pokles plazmatických hladín retinolu rovnako ako retinyl-palmitátu. U človeka je deficit vitamínu A definovaný Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) ako koncentrácia retinolu menšia ako 0,70 $\mu\text{mol/l}$. Tabuľka tiež ukazuje, že pokles príjmu vitamínu A súvisí aj s poklesom α -tokoferolu, čo poukazuje na fakt, že telo sa snaží napraviť a doplniť deficit tohto vitamínu a hladiny vitamínov spolu súvisia.

5.3 Stanovenie markerov epiteliálno-mezenchymálneho prechodu

Ako bolo vysvetlené v predchádzajúcich častiach, epiteliálno-mezenchymálny prechod je proces, v ktorom sa z epiteliálnych buniek zmenou ich fenotypu stávajú bunky mezenchymálne. Tento dej môže byť súčasťou fyziologických procesov, ale môže poukazovať aj na patologické deje v organizme, napríklad rozvoj fibrotických

zmien. Pri tomto prechode vznikajú rôzne proteíny (napr. vimentín), ktoré sa využívajú ako mezenchymálne markery a naopak, mnoho proteínov (napr. aquaporín-5, E-cadherín) s funkciou epiteliálnych markerov zaniká. Vznik a zánik markerov je ovplyvňovaný fibrotickým cytokínom TGF- β_1 , ktorý vyvoláva proces epiteliálno-mezenchymálneho prechodu. Jeho chronicky zvýšené hladiny spôsobujú excesnú fibrózu.

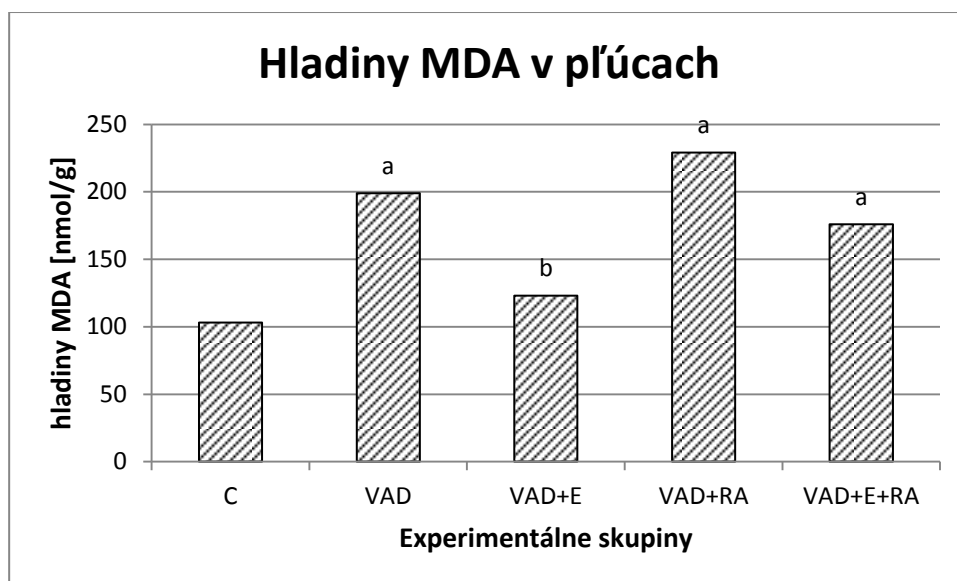
Boli stanovené hladiny vimentínu, aquaporínu-5 a E-cadherínu, aby sa mohla potvrdiť hypotéza o prebiehajúcich fibrotických procesoch v pľúcach. Získané hodnoty sa navzájom líšili a tým poukazovali na prítomnosť endoteliálno-mezenchymálneho procesu, no neboli však štatisticky významné a preto zmeny ich hodnôt jednoznačne nepotvrdzujú prítomnosť EMT vo vzťahu k deficitu vitamínu A.

5.4 Stanovenie parametrov oxidačného stresu

Pre stanovenie parametrov oxidačného stresu bolo potrebné zistiť hladiny malóndialdehydu, glutatiónu a oxidovaného glutatiónu, ktoré sú využívané ako ukazovatele oxidačného stresu a pôsobenia voľných radikálov. To, či bude proces oxidácie a vzniku radikálov prebiehať, závisí od pomeru voľných radikálov a antioxidačných látok. Ako bolo spomenuté, aktivita antioxidantov ako vitamín A alebo vitamín E však závisí od ich koncentrácie a parciálneho tlaku kyslíka. V prípade vitamínu A aj od konkrétnej formy, pretože retinol je účinnejší antioxidant ako kyselina retinová, a naopak kyselina retinová má výraznejšie prooxidačné funkcie ako retinol.

Aby sa zistil stupeň oxidačného stresu, boli stanovené hladiny MDA, GSH a GSSG v pľúcach potkanov, pričom v prípade glutatiónu sa hodnotila zmena pomeru GSH/GSSG. Týmto stanovením sa malo potvrdiť, že pokles vitamínu A spôsobuje zvýšený oxidačný stres a podávanie vitamínu E ho naopak znižuje. Tiež boli pozorované účinky kyseliny retinovej na tieto hodnoty.

Hladiny pľúcneho malóndialdehydu (MDA) – sa stanovili metódou HPLC popísanou v stati 4.8 pre všetky skupiny zvierat, čiže pre skupiny C, VAD, VAD+E, VAD+RA a VAD+E+RA. Nemerané výsledky sú uvedené na obrázku č. 6.

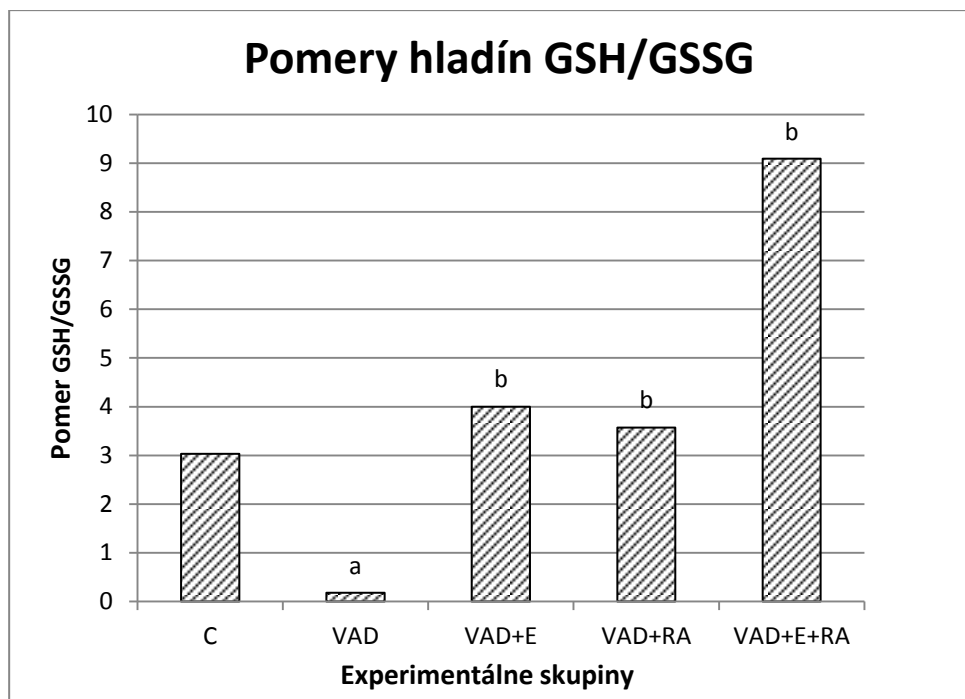


Obrázok 6: Namerané hladiny malóndialdehydu v pľúcach potkanov všetkých skupín experimentu uvedené v nmol/g pľúcneho tkaniva.

Uvedené hodnoty predstavujú aritmetické priemery získaných hodnôt, pričom v každej skupine sa nachádzalo 5 potkanov. Písmenom „a“ sú označené výsledky výrazne odlišné od kontrolnej skupiny, s hodnotou $P < 0,05$ a písmenom „b“ hodnoty výrazne odlišné od skupiny VAD, s hodnotou $P < 0,05$.

Ako je možné vidieť na uvedenom grafe, podávanie vitamínu E znížilo hodnoty malóndialdehydu, ktoré boli následkom deficitu vitamínu A značne zvýšené. Taktiež sa prejavili prooxidačné vlastnosti kyseliny retinovej, ktorá vyvolala zvýšenie oxidačného stresu, čo sa prejavilo aj zvýšenými hladinami MDA.

Hladiny pľúcneho glutatiónu (GSH) a oxidovaného glutatiónu (GSSG) - boli taktiež namerané pomocou metódy HPLC a postup je detailne popísaný v statiach 4.9 a 4.10. Získané hladiny boli hodnotené ako výsledný pomer GSH/GSSG, pričom zníženie pomeru poukazuje na zvýšený oxidačný stres. Tieto pomery boli stanovené pre všetky skupiny experimentu – C, VAD, VAD+E, VAD+RA a VAD+E+RA. Získané hodnoty sú uvedené na obrázku č. 7.



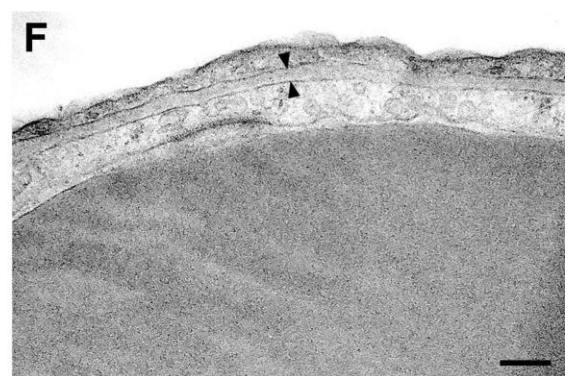
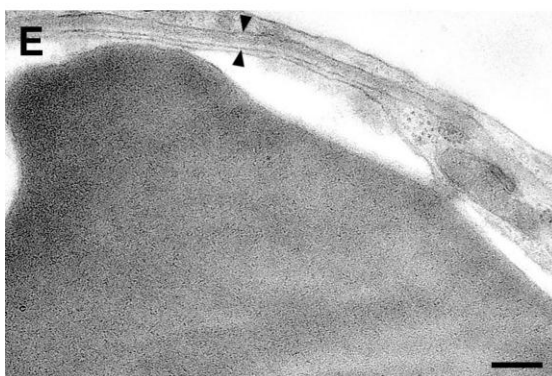
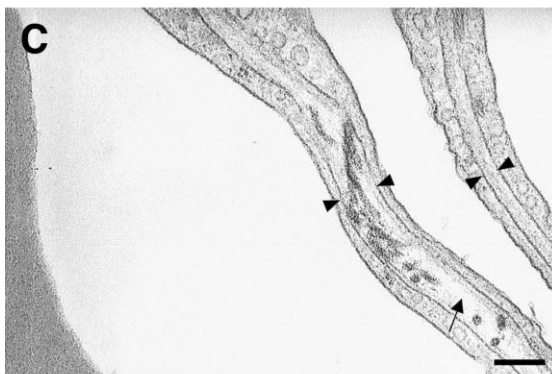
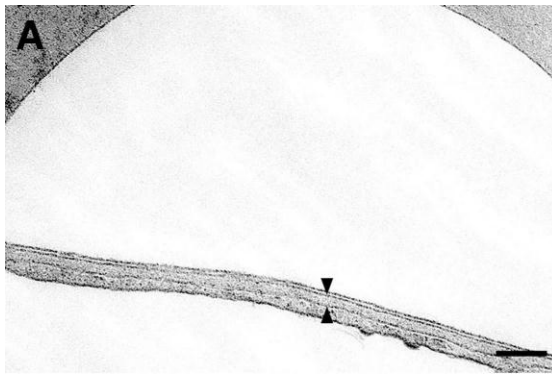
Obrázok 7: Namerané hodnoty glutatiónu a oxidovaného glutatiónu uvedené ako pomer GSH/GSSG

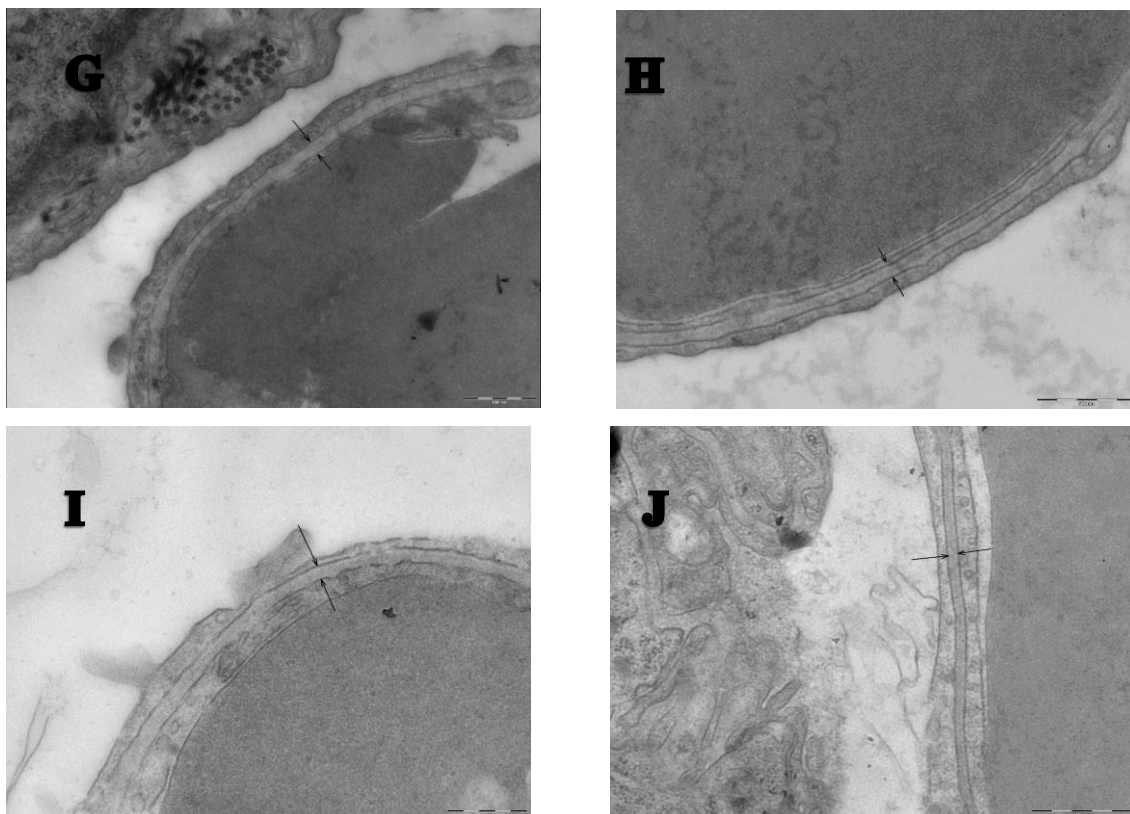
Zobrazené hodnoty sú aritmetickým priemerom nameraných hodnôt a v každej skupine sa nachádzalo 5 potkanov. Písmenom „a“ sú označené výsledky výrazne odlišné od skupiny C, a písmenom „b“ výsledky výrazne odlišné od skupiny VAD, s hodnotou $P < 0,05$.

Z grafu je zrejmé, že nedostatok vitamínu A spôsobuje značný úbytok glutatiónu a pomer GSH/GSSG sa výrazne znižuje. Na zvýšenie tohto pomeru pôsobí priaznivo dodávanie vitamínu E rovnako ako príjem kyseliny retinovej. Na rozdiel od hodnôt malondialdehydu, hodnoty GSH/GSSG poukazujú na fakt, že kyselina retinová pôsobí proti oxidačnému stresu znižovaním hladín oxidovaného glutatiónu.

5.5 Štúdium ultraštruktúry alveolárnej bazálnej membrány

Tento experiment bol zameraný na alveolárnu bazálnu membránu, ktorá je charakteristická svojim vysokým obsahom kolagénu typu IV. Pľúca sú dôležitým orgánom a preto sa skúmal efekt deficitu vitamínu A a tiež účinok podávania vitamínu E či retinovej kyseliny na ich bazálnu membránu. Ultraštruktúra alveolárnej BM bola pozorovaná transmisným elektrónovým mikroskopom Philips-CM 100. Na nasledujúcich obrázkoch je možné pozorovať účinok nedostatku vitamínu A či vplyvy vitamínu E a kyseliny retinovej.

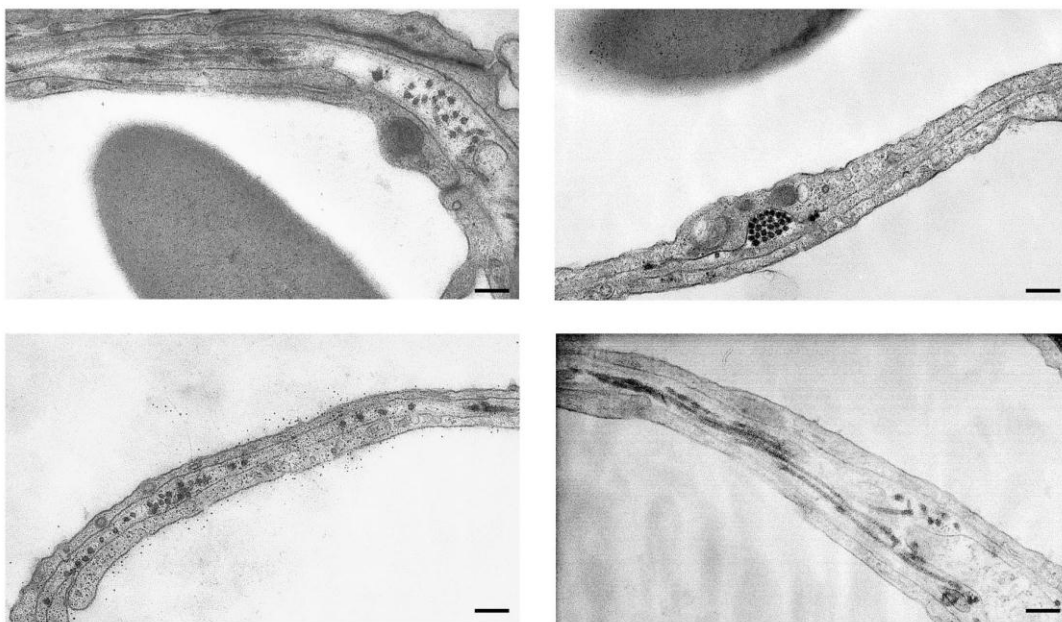




Obrázok 8: Alveolárne bazálne membrány pľúc potkanov rôznych skupín zvierat

Obrázky A a B znázorňujú alveolárne BM potkanov kontrolnej skupiny C; obrázky C a D sú zo skupiny VAD a obrázky E a F znázorňujú zmenu alveolárnej membrány po podaní kyseliny retinovej, čiže sú zo skupiny VAD+RA. Obrázky G a H reprezentujú ABM skupiny VAD+E a obrázky I a J skupinu VAD+E+RA.

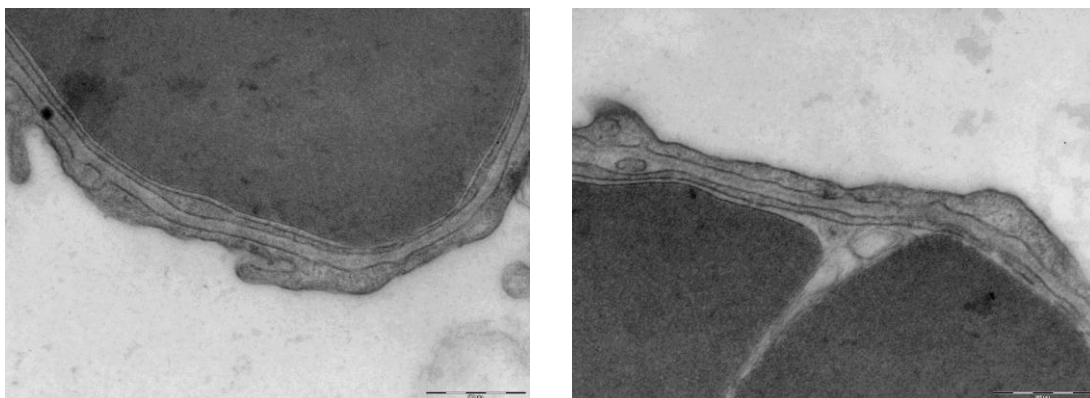
Na každej snímke z elektrónového mikroskopu je zobrazená alveolárna oblasť pľúc, pričom alveolárna bazálna membrána sa nachádza medzi šípkami. Na snímkach C a D zo skupiny VAD je možné zreteľne vidieť, že deficit vitamínu A spôsobuje nápadné zhrubnutie tejto membrány, stratu jej celistvosti a tiež dochádza k hromadeniu kolagénových vlákien v BM. Podávanie injekcií kyseliny retinovej však viedlo k výraznému zlepšeniu stavby, kompozície a hrúbky alveolárnej BM, čo dokazujú snímky E a F, pričom aj množstvo kolagénu bolo zredukované. Aj snímky G, H, I a J dokazujú priaznivý účinok vitamínu E a aj jeho kombinácie s kyselinou retinovou na bazálnu membránu. V týchto prípadoch (skupiny VAD+E a VAD+E+RA) nedošlo k výraznému zhrubnutiu ani k strate celistvosti membrán. Podávanie vitamínu E a kyseliny retinovej má teda priaznivý vplyv na stavbu, kompozíciu a celistvosť bazálnej membrány.



Obrázok 9: Detaily zhlukov kolagénových vlákien v alveolárnej bazálnej membráne pľúc potkanov skupiny VAD.

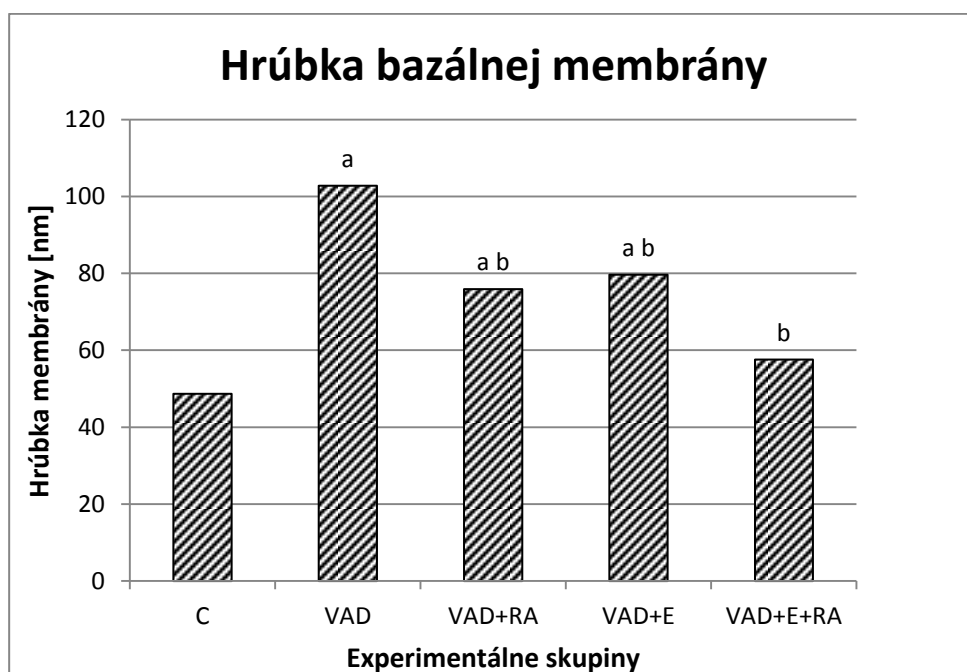
Na obrázku 9 je možné pozorovať prejavy deficitu vitamínu A, konkrétne vzniknuté depozitá kolagénu. Taktiež je zreteľné zhrubnutie bazálnej membrány a jej nepravidelnosť. Pravdepodobne sa jedná o kolagén typu I, pričom jeho prítomnosť je neobvyklá, pretože za normálnych fyziologických podmienok nie je súčasťou štruktúry a kompozície bazálnej membrány. Bol už však pozorovaný aj v iných prípadoch pľúcnych patológií a tiež v transplantovaných pľúcach.

Prítomnosť týchto kolagénových vlákien poukazuje na výrazné poškodenie BM súvisiace so vznikom rôznych chorôb. Podobný úkaz sa prejavuje u chorôb ako idiopatická pľúcna fibróza alebo glomerulárna skleróza. V niektorých prípadoch sa depozitá kolagénu nachádzajú v tesnej blízkosti endoteliálnych buniek, čo vyvoláva domnienku, že kolagén je produkovaný práve týmito bunkami v dôsledku určitého stimulu vyvolaného deficitom vitamínu A. Veľmi dôležitým zistením však ostáva fakt, že podávanie kyseliny retinovej výrazne, takmer úplne znižuje množstvo nahromadeného kolagénu.



Obrázok 10: Depozitá kolagénu typu I v alveolárnej bazálnej membráne potkanov skupiny VAD+E.

Na týchto fotografiách je možné vidieť taktiež depozitá kolagénu typu I, ale v porovnaní so skupinou VAD sú v značne menšom množstve. Pozorovania rôznych zvierat rovnakej skupiny potvrdzujú, že vitamín E redukuje množstvo prítomného kolagénu nahromadeného v dôsledku deficitu vitamínu A.



Obrázok 11: Hrúbka bazálnych membrán všetkých skupín experimentu.

Graf zobrazuje hrúbky BM, pričom hodnoty predstavujú aritmetický priemer hodnôt každej skupiny obsahujúcej 5 experimentálnych zvierat. Hodnoty boli získané meraním na snímkach elektrónovej mikroskopie. Písmeno „a“ označuje hodnoty výrazne odlišné od hodnôt skupiny C a písmeno „b“ označuje hodnoty výrazne odlišné od skupiny VAD, pričom hodnota $P < 0,05$.

Tento graf názorne zobrazuje efekt deficitu vitamínu A rovnako ako podávania kyseliny retinovej a zvýšeného príjmu vitamínu E. Pri nedostatku vitamínu A došlo až k dvojnásobnému zhrubnutiu bazálnej membrány, pričom kyselina retinová znížila rozdiel hrúbok skupiny VAD a C na polovicu. V prípade skupiny VAD+E bola síce BM tiež hrubšia oproti kontrolnej skupine, ale vitamín E preukázal lepšie výsledky v porovnaní so skupinou VAD. Podávanie kyseliny retinovej sa prejavilo ako účinný prostriedok proti zhrubnutiu bazálnej membrány a vo všeobecnosti zlepšuje jej vlastnosti.

6 DISKUSIA

Táto diplomová práca je založená na experimente, ktorý bol zrealizovaný G. Esteban-Pretel-om a kolektívom v roku 2008 na katedre biochémie a molekulárnej biológie na farmaceutickej fakulte Valencijskej univerzity (Universidad de Valencia) v Španielsku. Aj tento pokus bol zameraný na alveolárnu bazálnu membránu pľúc potkanov a sledovalo sa mnoho rôznych faktorov. Rovnako ako v tejto diplomovej práci sa sledoval efekt deficitu vitamínu A na hrúbku membrány, množstvo kolagénových vlákien a tiež hladiny malóndialdehydu. Okrem toho sledovali hladiny iných ukazovateľov ako je TNF- α (tumor nekrotizujúci faktor α), interleukíny IL-1 α a IL-1 β , aktivitu *myeloperoxidasy* či peroxidáciu lipidov (Esteban-Pretel et al. 2008).

Experiment popísaný v tejto diplomovej práci mal teda potvrdiť niektoré fakty stanovené predošlým pokusom a tiež priniesť nové výsledky. Aj tu sa hodnotil nepriaznivý efekt nedostatku vitamínu A na alveolárnu bazálnu membránu, ale sledoval sa najmä účinok vitamínu E na vzniknuté zmeny. Rovnako bol pozorovaný efekt podávania vitamínu E v kombinácii s kyselinou retinovou, pričom zakaždým bol tento vitamín podávaný vo vysokých dávkach. Nepriaznivé účinky deficitu vitamínu A na bazálnu membránu boli potvrdené. Boli dosiahnuté podobné výsledky uvedené a popísané v kapitole 5 (VÝSLEDKY) a pozorované markantné zmeny membrán, ich hrúbky a obsahu kolagénu a potvrdil sa tiež predpoklad priaznivého pôsobenia vitamínu E na vzniknuté zmeny. Aby bolo možné zhodnotiť efekt podávania vitamínu E na bazálnu membránu, ktorá bola poškodená vplyvom deficitu vitamínu A, bolo nutné navodiť rovnaké podmienky pre rozvoj porovnateľného poškodenia membrány. Preto sa v oboch pokusoch zaobchádzalo s pokusnými zvieratami za rovnakých okolností (teplota miestnosti, svetelný režim, potrava, dĺžka života, podávanie kyseliny retinovej a pod.).

V pôvodnom, základnom experimente boli tiež použité samci potomstva, ktorí boli najprv rozdelení do dvoch skupín. Prvú z nich predstavovala kontrolná skupina a druhá dostávala potravu bez vitamínu A (VAD skupina). Týmto spôsobom boli kŕmené tiež počas 60-tich dní. Po uplynutí tejto doby boli kontrolné potkany usmrtené a potkanom

skupiny VAD bola podávaná kyselina retinová vo forme intraperitoneálnej injekcie po dobu 10-tich dní. Následne bola táto skupina taktiež usmrtená.

Ako už bolo spomenuté, v prvotnom experimente, ktorý bol publikovaný v roku 2008 v časopise *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, sledovali zmeny bazálnej membrány a to hlavne jej hrúbky, obsahu kolagénu a tiež zmeny štruktúry a kompozície. Táto diplomová práca potvrdzuje všetky výsledky v tejto oblasti, pričom namerané hodnoty boli rádovo rovnaké. Pôvodný experiment však sledoval aj iné zmeny, ktoré už pre sekundárny experiment neboli dôležité. Sledovali sa napríklad hladiny cytokínov IL-1 α , IL-1 β , TNF- β a *myeloperoxidasy*, čím sa snažili odhaliť súvislosť poškodenia membrány so zápalovými procesmi. Tiež boli merané hladiny TGF- β a jeho vzťah k vzniknutým zmenám. Celý pokus teda naznačuje význam vitamínu A resp. vážne následky jeho deficitu a otvára možnosti pre ďalšie výskumy a experimenty akým je práve táto práca, ktorá poukazuje hlavne na výhodné vlastnosti vitamínu E a jeho kombinácie s kyselinou retinovou.

Primárny experiment tvoriaci východisko diplomovej práce sa taktiež opiera o predošlé výskumy. Rovnako sa jedná o výskum realizovaný na Valencijskej univerzite a viedol ho Marín M. P. a bol publikovaný v časopise *The Journal of Nutrition* 135 v roku 2005. Taktiež skúma bazálnu membránu, no v tomto prípade sú orgánom záujmu obličky, konkrétne renálna bazálna membrána. Sleduje sa dopad nedostatku vitamínu A hlavne na jej štruktúru a kompozíciu a tiež na vlákna kolagénu typu IV (Marín et al. 2005). Aj v tomto prípade boli použítí samci potomstva, ktorí prijímali potravu bez vitamínu A počas 50-tich dní. Po tejto dobe bola elektrónovou mikroskopiou analyzovaná bazálna membrána. Kolagén typu IV a jeho α -reťazce a tiež matrix degradujúce *metalloproteinasy* a tkáňové inhibítory *metalloproteinasy* boli stanovené imunocytochemicky a pomocou Western blottingu. Okrem toho boli hodnotené aj hladiny interleukínov a TNF- α (Tumor Necrosis Factor α). Tento výskum potvrdil dôležitosť príjmu vitamínu A, pretože jeho deficit v potrave viedol k poškodeniu renálnej bazálnej membrány a to hlavne v BM renálnych tubulov. Zvýšil sa tiež obsah kolagénu typu IV, ale jednotlivé reťazce α , ktoré ho tvoria, boli zastúpené v odlišnom množstve a pomere oproti kontrolnej skupine.

Existuje niekoľko ďalších experimentov, v ktorých je potvrdená dôležitosť vitamínu A, vitamínu E či kyseliny retinovej pre svoj antioxidačný účinok. Napríklad experiment popísaný v roku 2005 v časopise *Respiratory Research* 6, ktorý zrealizovali S. E. McGowan, E. J. Takle a A. J. Holmes potvrdzuje, že deficit vitamínu A vedie k zvýšeniu hyperreaktivity pľúc u potkanov a k zníženiu hustoty alveol. V tomto pokuse boli tiež potkany kŕmené potravou s nedostatkom vitamínu A (VAD). Táto potrava im bola podávaná po dobu 7-mich až 10-tich týždňov a následne sa im perorálne aplikovala kyselina retinová (25 µg) po dobu 12 a 21 dní. Potkany skupiny VAD mali menšie koncentrácie elastických vlákien v pľúcach a množstvo elastínu sa taktiež znížilo. Po 12-dňovom podávaní kyseliny retinovej došlo k obnoveniu koncentrácie elastických vlákien. Na množstvo elastínu však kyselina retinová nemala signifikantný vplyv (McGowan et al. 2005).

V roku 2003 bol publikovaný v časopise *American Journal of Physiology* ďalší z výskumov zameraných na deficit vitamínu A. Potkany s rozvinutým nedostatkom vitamínu A mali nepriaznivo ovplyvnené respiračné funkcie. Dýchací odpor bol zvýšený približne dvakrát. Tieto nepriaznivé zmeny boli však po 12-tich dňoch podávania kyseliny retinovej znormalizované až na hodnoty kontrolnej skupiny. Rovnako aj počet elastických vlákien poklesol v dôsledku nedostatku vitamínu A a aj v tomto prípade sa potvrdil priaznivý účinok kyseliny retinovej, ktorá zvýšila ich množstvo (McGowan, Holmes and Smith 2003).

Pokus uverejnený v roku 2010 v časopise *The New England Journal of Medicine*, ktorý zrealizovali W. Checkley a kolektív, bol zameraný tiež na dopady deficitu vitamínu A, ale sledovala sa dôležitosť jeho príjmu v období pred otehotnením, počas gravidity a tiež v období laktácie. Pozorované boli zmeny v súvislosti s pľúcnyimi funkciami a s formáciou alveol. U potomstva boli pľúcne funkcie monitorované spirometricky a potvrdili dôležitý význam vitamínu A práve v období vývoja človeka (Checkley et al. 2010).

Ďalší pokus, ktorý povrdzuje nepriaznivý vplyv deficitu vitamínu A na organizmus je experiment publikovaný v časopise *The Journal of Nutrition* v roku 2000. Na jeho realizácii sa podieľali R. C. Baybutt, L. Hu a A. Molteni. Bol zameraný na parenchým pľúc a pečene a potvrdil, že deficit vitamínu A spôsobuje výrazné zmeny. Potkany boli kŕmené potravou s nedostatkom vitamínu A počas 6-tich týždňov a potom sa hodnotili

vzniknuté zmeny. V telesnej hmotnosti potkanov VAD skupiny a kontrolnej skupiny nebol žiaden rozdiel, ale štruktúra pľúcneho parenchýmu vykazovala markantné zmeny. Jedná sa o pokles množstva kolagénových vlákien v alveolárnych septách, pričom septá boli v porovnaní s kontrolnou skupinou tenšie. V niektorých oblastiach pľúc dokonca došlo k zániku medzialveolárnych prepážok a pľúca sa javili ako emfyzematózne. Zredukovalo sa aj množstvo elastínu, čo tiež negatívne ovplyvňuje funkciu pľúc. Tiež boli pozorované pneumocyty typu II a tvorba surfaktantu, pričom v oboch prípadoch bolo možné u potkanov skupiny VAD pozorovať zhoršenie. Okrem pľúcnych buniek došlo aj k poškodeniu parenchymatických buniek pečene (Baybutt et al. 2000).

Neboli však zrealizované výskumy zamerané na poškodenie membrány pľúc pre deficit vitamínu A a ovplyvnenie vitamínom E a kyselinou retinovou. Preto nie je možné priamo porovnať výsledky popísané v tejto práci s výsledkami dosiahnutými v iných experimentoch.

7 ZÁVERY

- Na základe hladín markerov oxidačného stresu ako je malóndialdehyd a glutatión sa potvrdilo, že vitamín A pôsobí ako antioxidant, pretože jeho deficit spôsoboval výrazné zvýšenie oxidačného stresu a hladiny spomínaných markerov vykazovali značné rozdiely u potkanov v skupinách s bežnou potravou a s deficitom vitamínu A.
- Neprítomnosť vitamínu A v potrave mala za následok aj zníženie telesnej hmotnosti potkanov v dôsledku zníženého príjmu potravy a tiež boli zistené početné zmeny na alveolárnej bazálnej membráne. Táto membrána mala oproti kontrolnej skupine väčšiu hrúbku, boli v nej nahromadené početné kolagénové vlákna a taktiež bola narušená jej integrita.
- Zvýšený príjem vitamínu E výrazne znižoval oxidačný stres vyvolaný deficitom vitamínu A, čo bolo potvrdené nameranými hladinami markerov oxidačného stresu. Kyselina retinová podávaná potkanom s deficitom vitamínu A však u nich oxidačný stres ešte viac prehĺbila, pravdepodobne kvôli svojej vysokej koncentrácii, v ktorej prevládal jej prooxidačný efekt.
- Zmeny bazálnej membrány spôsobené nedostatkom vitamínu A boli zvrátené obidvoma látkami – vitamínom E aj kyselinou retinovou a taktiež ich kombináciou. Došlo k zmenšeniu hrúbky membrány, výrazne sa znížil obsah kolagénových vlákien a zmiernilo sa narušenie jej celistvosti.

8 ZOZNAM SKRATIEK

ABM – alveolárna bazálna membrána; Alveolar Basement Membrane

AIN – americký inštitút výživy; American Institute of Nutrition

ANOVA – analýza rozptylu; Analysis Of Variance

BDMA – benzyldimetylamín; BenzylDiMethylAmine

BHT – butylhydroxytoluén; ButylHydroxyToluene

BM – bazálna membrána; Basement Membrane

C – kontrolná skupina; Control

CAM – molekuly bunkovej adhézie; Cell Adhesion Molecules

CDNB – 1-chlór-2,4-dinitrobenzén; 1-Chlor-2,4-DiNitroBenzene

DDSA – dodecenyl sukcinyl anhydrid; DoDecenyl Succinyl Anhydride

ECM – extracelulárna matrix; ExtraCellular Matrix

EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová; EthyleneDiamineTetraacetic Acid

EMT – epiteliálno-mezenchymálny prechod; Epithelial-Mesenchymal Transition

FDNB – 1-fluór-2,4-dinitrobenzén; 1-Fluoro-2,4-DiNitroBenzene

GAG – glykozaminoglykány; GlycosAminoGlycans

GS-DNB – komplex glutatiónu s dinitrobenzénom

GSH – glutatión

GSH-NEM – komplex glutatiónu s N-etylmaleimidom

GSSG – oxidovaný glutatión

GST – *glutatión-S-transferáza*

HDL – lipoproteín s vysokou hustotou; High Density Lipoprotein

HPLC – vysoko účinná kvapalinová chromatografia; High Performance Liquid Chromatography

CHES – 2-(N-cyklohexylamino)etánsulfónová kyselina; 2-(N-CycloHexylamino)-Ethane Sulfonic Acid

IL-1 α – interleukín 1 α

IL-1 β – interleukín 1 β

IU – medzinárodná jednotka; International Unit

LDL – lipoproteín s nízkou hustotou; Low Density Lipoprotein

MARCO – makrofágové receptory s kolagénovou štruktúrou

MDA – malóndialdehyd; Malon DiAldehyde

NADPH – redukovaný nikotínamid-adenín-dinukleotid-fosfát

NEM – N-etylmaleimid; N-EthylMaleimide

NMA – Nadic Methyl Anhydride

PBS - fosfátový fyziologický roztok; Phosphated Buffered Saline

PCA – perchlórová kyselina; PerChloric Acid

PDA – detektor s fotodiódovým poľom; PhotoDiode Array

PTFE – polytetrafluór etylén; PolyTetraFluoroEthylene

PVDF – difluorid polyvinylidénu; PolyVinylidene DiFlouride

RAR – receptory pre kyselinu retinovú; Retinoic Acid Receptors

RAREs – elementy odpovede kyseliny retinovej; Retinoic Acid Response Elements

RBP – retinol viažúci proteín; Retinol-Binding Protein

RXR – retinoidové X receptory; Retinoid X Receptors

RXREs – elementy odpovede retinoidov; Retinoid X Response Elements

SDS – dodecyl sulfát sodný; Sodium Dodecyl Sulfate

TBA – tiobarbiturová kyselina; ThioBarbituric Acid

TGF- β – transformujúci rastový faktor β ; Transforming Growth Factor β

TNF- α – tumor nekrotizujúci faktor; Tumor Necrosis Factor α

TTR – transthyretín

VAD – skupina s deficitom vitamínu A; Vitamin A Deficiency

VAD+E – skupina s deficitom vitamínu A a dopĺňaním vitamínu E;
Vitamin A Deficiency + vitamin E

VAD+E+RA – skupina s nedostatkom vitamínu A a doplňovaním vitamínu E a kyseliny retinovej; Vitamin A Deficiency + vitamin E + Retinoic Acid

VAD+RA – skupina s deficitom vitamínu A a s doplňovaním kyseliny retinovej; Vitamin A Deficiency + Retinoic Acid

VEGF – cievny endoteliálny rastový faktor; Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL – lipoproteín s veľmi nízkou hustotou; Very Low Density Lipoprotein

WHO – svetová zdravotnícka organizácia; World Health Organization

α -TTP – α -tokoferol prenášajúci proteín; α -Tocopherol Transfer Protein

9 LITERATÚRA

Adams J. C. (2002) Native and Recombinant Basement Membrane Proteins. In: Methods in Cell-Matrix Adhesion. Academic Press, San Diego, 114-123

Ahuja H. S., Szanto A. and Nagy L. (2003) Retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents 17, 29-45

Alberts B. (1998) Cytoskelet. V: Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Espero, Ústí nad Labem, 513-546

Ball G. F. M. (2004) Vitamins: Their Role in the Human Body. Blackwell Publishing, Oxford

Barnes P. J., Drazen J., Rennard S. I. and Thomson N. C. (2009) Epithelial cells. In: Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management. 2nd ed. Academic, Amsterdam, 201-210

Baybutt R. C., Hu L. and Molteni A. (2000) Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. The Journal of Nutrition 130, 1159-1165

Bosman F. T. and Stamenkovic Ivan (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. The Journal of Pathology 200, 423-428

Bourassa M. G. and Tardif J. C. (2006) Antioxidant and Cardiovascular Diseases. 2nd ed. Springer, New York

Bugge T. H., Pohl J., Lonnoy O. and Stunnenberg H. G. (1992) RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. The EMBO Journal, 1409-1418

Burton G. W. (1988) Antioxidant Action of Carotenoids. The Journal of Nutrition 119, 109-111

Burton G. W. and Ingold K.U. (1984) Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569-573

Cadenas E. and Packer L. (2002) *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York

Espeseth A. S., Murphy S. P. and Linney E. (1989) Retinoic acid receptor expression vector inhibits differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Genes & Development*, 1647-1656

Esteban-Pretel G., Marín M. P., Renau-Piqueras J., Barber T. and Timoneda J. (2010) Vitamin A deficiency alters rat lung alveolar basement membrane: reversibility by retinoic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 227-36

Freedman L. P. (1998) *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors*. Birkhäuser, Boston

Gelse K., Pöschl E. and Aigner T. (2003) Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 1531-46

Hay E. D. (1991) *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd ed. Plenum Press, New York

Hodáková Jarmila (2007) *Vliv nativního a oxidativně modifikovaného kolagenu na funkční vlastnosti profesionálních fagocytů*. Diplomová práce. Ústav experimentální biologie. Přírodovědecká fakulta Univerzity Masarykovy, Brno

Horwitz A.F. (1997) Cell adhesion molecules. *Scientific American* 276, 68

Hudson B., Tryggvason K. and Nielson E. G. (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *The New England Journal of Medicine* 348, 2543-2556

Checkley W., West K. P., Wise R. A., Baldwin M. R., Wu L., LeClerq S. C., Christian P., Katz J., Tielsch J. M., Khatry S. and Sommer A. (2010) Maternal vitamin A supplementation and lung function in offspring. *The New England Journal of Medicine* 362, 1784-1794

Cheeke P. R. and Dierenfeld E. S. (2010) Comparative Animal Nutrition and Metabolism. CABI, Cambridge

Junqueira L. C., Carneiro J. and Kelley R. O. (1997) Základy histologie. 1. vyd. H&H, Jinočany

Kalluri R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 422-433

Kalluri R. and Neilson E. G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1776-1784

Kalluri R. and Weinberg R. A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 1420-1428

Kefalides N. A. and Borel J. P. (2005) Basement Membranes: Cell and Molecular Biology. Elsevier, California

Kliwer S. A., Umesono K., Noonan D. J., Heyman R. A. and Evans R. M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 771-774

Lifton R.P. (2009) Genetic Disease of the Kidney. Elsevier Academic Press, Burlington

Litwack G. (2003) Vitamins and Hormones. Elsevier Academic Press, Amsterdam

Liu S. Q. (2007) Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. Wiley-Interscience, Hoboken

Lodish H. (1995) Molecular Cell Biology. 4th ed. W. H. Freeman, New York

Luca L. M. (1991) Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *The FASEB Journal* 14, 2924-2933

Marín M. P., Esteban-Pretel G., Alonso R., Sado Y., Barber T., Renau-Piqueras J. and Timoneda J. (2005) Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *The Journal of Nutrition* 135, 695-701

Marks M. S., Hallenbeck P. L., Nagata T., Segars J. H., Appella E., Nikodem V. M. and Ozato K. (1992) H-2RIIBP (RXR beta) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *The EMBO Journal*, 1419-1435

McGowan S. E., Holmes A. J. and Smith J. (2003) Retinoic acid reverses hyperresponsiveness but not the parenchymal defect that is associated with vitamin A deficiency. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 286, 437-444

McGowan S. E., Takle E. J. and Holmes A. J. (2005) Vitamin A deficiency alters the pulmonary parenchymal elastic modulus and elastic fiber concentration in rats. *Respiratory Research* 6, 77

Mecham R. P. (2011) *The Extracellular Matrix: an Overview*. Springer, Berlin

Nau H. and Blaner W. S. (1999) *Retinoids: the Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Springer, Berlin

Nieto M. A. (2001) The early steps of neural crest development. *Mechanisms of Development* 105, 27-35

Royce P. M. and Steinmann B. (2002) *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects*. 2nd ed. Wiley-Liss, New York

Sen Ch. K., Packer L. and Hänninen O. (2000) *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. 1st ed. Elsevier, New York

Sherbet G. V. (1997) *Retinoids: their Physiological Function and Therapeutic Potential*. Vol. 3. JAI Press Inc., Greenwich

Shook D. and Keller R. (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development* 120, 1351-1383

Shoulders M. D. and Raines R.T. (2009) Collagen structure and stability. *The Annual Review of Biochemistry* 78, 929-958

Slinger P. (2011) Principles and Practice of Anesthesia for Thoracic Surgery. Springer, New York

Stoker H. S. (2010) Organic and Biological Chemistry. Brooks/Cole, Belmont

Tryggvason K. and Patrakka J. (2006) Thin basement membrane nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology 17, 813-822

Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M. and Niki E. (1995) Action of beta-carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 323, 137-147

Willis B. C. and Borok Z. (2007) TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology 293, 525-534

Wiswedel I., Salerno C., Crifo C., Augustin W., Schild L., Langhans C. D. and Sommerburg O. (2005) β -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions – potential side effects of high-dose β -carotene supplementation. The Journal of Nutritional Biochemistry 16, 385-397

Yoshikazu T., Xiaojing Y. and Scott S. (2007) The integrins. Genome Biology 8, 215

Zachman R. D. (1995) Role of vitamin A in lung development: Role of nutrition in lung development and function. The Journal of Nutrition 125, 1534-1638

Zhang X. K., Lehmann J., Hoffmann B., Dawson M. I., Cameron J., Graupner G., Hermann T., Tran P. and Pfahl M. (1992) Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. Nature, 587-591

Použité obrázky:

<http://www.annualreviews.org/na101/home/literatum/publisher/ar/journals/content/cellbio/2004/cellbio.2004.20.issue->

[1/annurev.cellbio.20.010403.094555/production/images/medium/cb200255.f1.gif](http://annurev.cellbio.20.010403.094555/production/images/medium/cb200255.f1.gif) -

použité v januári 2012

<http://themedicalbiochemistrypage.org/images/retinol.jpg> - použité v januári 2012

<http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/r/O/1/retinal.jpg> - použité v januári 2012

http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/s/O/1/Retinoic_Acid.jpg - použité v januári 2012

<http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/uspnf/pub/images/v28230/g-77.gif> - použité v januári 2012

<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/tocol/Figure1.png> - použité v januári 2012